

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO
JEQUITINHONHA E MUCURI - UFVJM**

NÁTHALE RODRIGUES PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO E DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* MEDIADA PELO
SISTEMA 2,4-PENTANODIONA/HORSERADISH
PEROXIDASE/OXIGÊNIO**

**DIAMANTINA-MG
2014**

NÁTHALE RODRIGUES PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO E DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* MEDIADA PELO
SISTEMA 2,4-PENTANODIONA/ *HORSERADISH*
PEROXIDASE/OXIGÊNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível de Mestrado, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rodrigues

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Helen Rodrigues Martins

**DIAMANTINA-MG
2014**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Nathália Machado Laponez Maia – CRB6/3002

P654a
2014

Pinheiro, Náthale Rodrigues.

Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e da citotoxicidade *in vitro* mediada pelo sistema 2,4-pentanodiona/horseradish peroxidase/oxigênio / Náthale Rodrigues Pinheiro. – 2014.

149 p. : il., tabs.

Orientadora: Profª Drª Ana Paula Rodrigues

Coorientadora: Profª Drª Helen Rodrigues Martins.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, 2014.

1. Antibody-directed produg therapy. 2. 2,4-pentanodiona. 3. Ácido indol-3-acético. 4. Horseradish peroxidase. 5. Espécies reativas de oxigênio. I. Rodrigues, Ana Paula. II. Martins, Helen Rodrigues. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV. Título.

CDD 615.58

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO E DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* MEDIADA PELO
SISTEMA 2,4-PENTANODIONA/HORSERADISH
PEROXIDASE/OXIGÊNIO**

Náthale Rodrigues Pinheiro

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas,
nível de Mestrado, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: 28/03/2014

Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo- UFVJ

Pof. Dr. Marcos Aurélio de Santana- UFOP

Profa. Dra. Ana Paula Rodrigues – Presidente

Presidente

**DIAMANTINA-MG
2014**

Dedico esse trabalho aqueles que me motivaram e me fizeram seguir quando as circunstâncias ousavam me afastar do caminho.

“Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Um desafio tão grande quanto escrever essa dissertação foi utilizar um espaço tão restrito para agradecer a todos que fizeram parte da minha trajetória ao longo desses sete anos em Diamantina e que de uma forma ou de outra contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço a Deus pelas maravilhas realizadas em minha vida e pelas oportunidades a mim concedidas. Obrigada por me guiar nessa caminhada. Confio plenamente em seus desígnios e nos planos que tem traçado para mim.

Agradeço aos meus pais Eugênio e Imaculada que sempre primaram pela minha educação e me incentivaram a ir adiante. Obrigada pelo imenso amor a mim dedicado e, pelo exemplo de caráter e de vida. Que eu seja capaz de doar-me aos meus filhos da forma como fazem. À minha irmã Viviane, pelos conselhos maduros, incentivo e apoio incondicional ao longo desses anos e por compreender as minhas ausências.

Ao meu namorado Fernando pelo carinho e companheirismo. Agradeço por ter atravessado essa batalha ao meu lado sempre me dando força para continuar e me trazendo de volta à paz.

Aos amigos que estiveram sempre ao meu lado, inclusive nas horas difíceis. Obrigada por tornarem meus dias mais alegres e por compreenderem meus momentos de silêncio. Agradeço a Deus por colocá-los em meu caminho.

Ao João e Marcos por acreditarem tanto em mim e por me fazerem acreditar na minha capacidade. Agradeço pela força, proteção e por não me deixarem cair.

À Bárbara, Raquel, Laris e Tetê, minhas companheiras de casa, pela paciência e solicitude. Agradeço por dividirem comigo as angústias, as vitórias e os sonhos.

À Dayana e Fâmyla, alunas de iniciação científica que trabalharam ao meu lado e me ajudaram a concluir esse projeto.

Agradeço à Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri pelo acolhimento e pelas oportunidades.

À minha orientadora Profa. Ana Paula Rodrigues pelo convívio, oportunidade e confiança em meu trabalho. Obrigada por todos os conhecimentos transmitidos ao longo desses anos de parceria que teve início ainda na graduação.

A Profa. Helen R. Martins, minha co-orientadora, por ter me acolhido com tanto carinho na sua equipe. Sua disponibilidade demonstrada em todas as fases desse projeto foi muito importante para a sua concretização. Obrigada pela amizade e pelos conselhos.

Ao Prof. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Mello pela ajuda durante a realização dos experimentos. Suas dicas e sua experiência foram muito importantes para o meu crescimento profissional.

Aos meus professores da graduação e pós-graduação pelas contribuições à minha formação e por despertarem em mim o interesse pela carreira acadêmica.

Ao pessoal do LABIMUNO, BIOEX, LIM e do CipqSAÚDE em geral, pelo apoio e parceria. A ajuda de vocês foi imprescindível para a execução desse trabalho.

À Fundação de amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro necessário para a realização desse projeto.

A Diamantina, palco dos melhores anos da minha vida, cuja beleza encheu de encanto os meus dias.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a concretização desse sonho. Muito obrigada!

“Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver. Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um “Não”! É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

RESUMO

O sistema ADEPT (*antibody-directed enzyme prodrug therapy*) é uma terapia antitumoral que envolve a ativação catalítica de um pró-fármaco, nas proximidades do sítio tumoral, por uma enzima conjugada a um anticorpo monoclonal com afinidade para antígenos específicos das células tumorais. O sistema composto pela enzima *Horseradish peroxidase* (HRP) e ácido indol-3-acético (IAA) tem sido estudado para o emprego na terapia ADEPT, e associado à indução de apoptose de células tumorais. A 2,4-pentanodiona (PD) também atua como substrato da HRP sendo oxidada por ela através de uma reação cuja cinética é semelhante à da catálise do IAA e, portanto, pode representar uma alternativa para essa terapia. Este trabalho teve como objetivo realizar uma avaliação da citotoxicidade mediada pelos produtos provenientes da oxidação da PD pela HRP frente a diferentes linhagens celulares, utilizando para isso diferentes metodologias que determinam a viabilidade celular como o azul de Trypan, MTT e vermelho neutro assim, como a análise microscópica das alterações celulares induzidas por esses sistemas; estabelecer uma comparação com a citotoxicidade mediada pela oxidação do IAA catalisada pela mesma enzima; verificar a incidência de morte celular por apoptose mediada pelos sistemas IAA/HRP/O₂ e PD/HRP/O₂; além de verificar a produção e os tipos de espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pelos dois sistemas. Os experimentos permitiram evidenciar que as combinações PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂ levam a formação de ERO, sendo as espécies provavelmente formadas pela oxidação da PD o radical ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e pela oxidação do IAA o H₂O₂. Foi observado, somente para o IAA, um aumento na formação de ERO com o uso de uma maior concentração do substrato. Quanto ao estudo de viabilidade celular, esse permitiu evidenciar, através das três metodologias, o efeito citotóxico dos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂, no entanto, o ensaio do MTT mostrou-se mais sensível para esse estudo. A oxidação do IAA pela HRP induziu apoptose, contudo não foi possível identificar o tipo de morte celular mediada pelo sistema PD/HRP/O₂, provavelmente devido a um problema técnico durante algumas análises em citometria de fluxo, o *Quenhcinq*. Apesar de o sistema IAA/HRP/O₂ ter apresentado uma destruição celular mais expressiva, o substrato IAA quando testado na ausência da enzima mostrou-se

tóxico, o que não foi visto para a PD quando testada nas concentrações de 1; 1,5 e 2 mM, o que a torna um bom substrato para o emprego na terapia ADEPT.

Palavras-chave: ADEPT, 2,4-pentanodiona (PD), ácido indol-3-acético (IAA), *Horseradish peroxidase* (HRP), espécies reativas de oxigênio (ERO).

ABSTRACT

The system ADEPT (antibody-directed enzyme prodrug therapy) is an antitumor therapy that involves catalytic activation of a prodrug near the tumor site by an enzyme conjugated to a monoclonal antibody with affinity for specific antigens of tumor cells. The system composed by horseradish peroxidase (HRP) enzyme and indole-3-acetic acid (IAA) has been studied for the use in ADEPT therapy, and associated with apoptosis induction on tumor cells. The 2,4-pentanedione (PD) also acts as a substrate for HRP and being oxidized through a reaction whose kinetics is similar to the catalysis of IAA and, therefore, might represent an alternative to this therapy. This study aimed to conduct a evaluation of the cytotoxicity mediated by products from the oxidation of PD by HRP against different cell lines, using different methodologies that determine cell viability as Trypan blue, MTT and Neutral Red, as well as morphologic changes of the cell induced by these systems; establish a comparison with the cytotoxicity mediated by the oxidation of IAA catalyzed by the same enzyme; verify the incidence of apoptosis mediated by IAA/HRP/O₂ and PD/HRP/O₂ systems; besides verifying the production and types of reactive species oxygen (ROS) produced by the two systems. The experiments allowed to show that PD/HRP/O₂ and IAA/HRP/O₂ combinations lead to the formation of ROS, being the species probably formed by oxidation of PD the radical superoxide anion and hydrogen peroxide (H₂O₂) and by the oxidation of IAA the H₂O₂. It was observed only for the IAA, an increase in ROS production using a higher concentration of the substrate. Regarding the study of cell viability, this allowed to evidence, through the three methodologies, the cytotoxic effect of PD/HRP/O₂ and IAA/HRP/O₂ systems, however, the MTT assay proved more sensitive for this study. The oxidation of the IAA by HRP induced apoptosis, but could not identify the type of cell death mediated by PD/HRP/O₂ system, The oxidation of by HRP the IAA induced apoptosis, but could not identify the type of cell death mediated by PD/HRP/O₂ system, probably due to a technical problem for a few flow cytometric analyzes, the Quenching. Although IAA/HRP/O₂ system have presented a more significant cell destruction, the IAA substrate when tested in the absence of enzyme was toxic, what has not seen for PD when tested in the concentrations of 1, 1.5, and 2 mM, making it a good substrate for employment in ADEPT therapy.

Keywords: ADEPT, 2,4-pentanedione (PD), indole-3-acetic acid (IAA), Horseradish peroxidase (HRP), reactive oxygen species (ROS).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Terapia ADEPT.....	30
FIGURA 2: Representação tridimensional da isoforma C da enzima HRP.....	36
FIGURA 3: Grupo heme ou ferroprotoporfirina IX da HRP.....	37
FIGURA 4: Representação esquemática da ação catalítica da HRP.....	39
FIGURA 5: Espectro UV-Vis da <i>Horseradish Peroxidase</i> nas suas diferentes formas: estado fundamental (native) composto I e composto II.....	41
FIGURA 6: Estrutura química do ácido indol-3-acético (IAA).....	42
FIGURA 7: Principais produtos formados na oxidação do IAA pela HRP.....	43
FIGURA 8: Estrutura química dos compostos β -dicarbonílicos.....	47
FIGURA 9: Representação da tautomeria da 2,4-pentanediona.....	48
FIGURA 10: Mecanismo de oxidação da PD pela HRP.....	49
FIGURA 11: Redução do MTT por enzimas mitocondriais.....	53
FIGURA 12: Separação de células sanguíneas por gradiente de densidade usando o reagente Ficoll-Hystopaque.....	70
FIGURA 13: Monocamada de células L929 imediatamente, 4 h, 24 h e 48 h após a tripsinização e repique celular (aumento de 100X).....	72
FIGURA 14: Monocamada de células MDA-MB-231 imediatamente, 4 h, 24 h e 48 h após a tripsinização e repique celular (aumento de 100X).....	73
FIGURA 15: Produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação do IAA pela HRP na ausência de peróxido.....	84
FIGURA 16: Produção de ERO detectados pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação da PD pela HRP na ausência de peróxido.....	84
FIGURA 17: Variação de absorbância entre os meios reacionais contendo a PD na ausência e na presença da enzima para cada concentração do substrato.....	85
FIGURA 18: Ação da catalase na produção de ERO detectados pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação da PD 1 mM pela HRP na ausência de peróxido.....	87
FIGURA 19: Ação da catalase na produção de espécies reativas de oxigênio detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação da PD 3 mM pela HRP na ausência de peróxido.....	87

FIGURA 20: Ação da catalase na produção de ERO detectados pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação do IAA 1 mM pela HRP na ausência de peróxido.....	88
FIGURA 21: Ação da catalase na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação do IAA 3 mM pela HRP na ausência de peróxido.....	88
FIGURA 22: Ação do formato de sódio na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação da PD 1mM pela HRP na ausência de peróxido.....	89
FIGURA 23: Ação do formato de sódio na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação da PD 3 mM pela HRP na ausência de peróxido.....	89
FIGURA 24: Ação do formato de sódio na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação do IAA 1 mM pela HRP na ausência de peróxido.....	90
FIGURA 25: Ação do formato de sódio na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação do IAA 3 mM pela HRP na ausência de peróxido.....	90
FIGURA 26: Ação da superóxido dismutase na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação da PD 1 mM pela HRP na ausência de peróxido.....	91
FIGURA 27: Ação da superóxido dismutase na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação da PD 3 mM pela HRP na ausência de peróxido.....	92
FIGURA 28: Ação da superóxido dismutase na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação do IAA 1 mM pela HRP na ausência de peróxido.....	93
FIGURA 29: Ação da superóxido dismutase na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação do IAA 3 mM pela HRP na ausência de peróxido.....	93
FIGURA 30: Avaliação da citotoxicidade em leucócitos provenientes de doadores humanos voluntários mediada pela oxidação do IAA pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através das metodologias do AT (A) MTT (B) e VN (C).....	95

FIGURA 31: Avaliação da citotoxicidade em leucócitos provenientes de doadores humanos voluntários mediada pela oxidação da PD pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através das metodologias do AT (A) MTT (B) e VN (C).....	96
FIGURA 32: Avaliação da citotoxicidade em células L929 mediada pela oxidação do IAA pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através das metodologias do MTT (A) e VN (B).....	98
FIGURA 33: Avaliação da citotoxicidade em células L929 mediada pela oxidação da PD pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através das metodologias do MTT (A) e VN (B).....	99
FIGURA 34: Avaliação da citotoxicidade em células MDA-MB-231 mediada pela oxidação do IAA pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através das metodologias do MTT (A) e VN (B).....	101
FIGURA 35: Avaliação da citotoxicidade em células MDA-MB-231 mediada pela oxidação da PD pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através das metodologias do MTT (A) e VN (B).....	103
FIGURA 36: Comparação entre os ensaios MTT, VN e AT para a determinação da citotoxicidade mediada pela oxidação do IAA pela HRP.....	104
FIGURA 37: Comparação entre os ensaios MTT, VN e AT para a determinação da citotoxicidade mediada pela oxidação da PD pela HRP.....	105
FIGURA 38: Avaliação das alterações morfológicas em células MDA-MB-231 induzidas pela oxidação do IAA pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através da coloração de May-Grunwald e Giemsa.....	109
FIGURA 39: Avaliação das alterações morfológicas em células MDA-MB-231 induzidas pela oxidação da PD pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através da coloração de May-Grunwald e Giemsa.....	111
FIGURA 40: Avaliação da morte celular da linhagem MDA-MB-231 induzida pela oxidação do IAA e da PD pela HRP (2×10^{-6} M). Gráfico de distribuição pontual (<i>dot plot</i>) representativos de células coradas com anexina V-FITC e PI.....	114
FIGURA 41: Avaliação da morte celular da linhagem MDA-MB-231 induzida pela oxidação do IAA e da PD pela HRP (2×10^{-6} M) através da marcação com Anexina V-FITC (AV) e iodeto de propídeo (PI) por citometria de fluxo.....	115
FIGURA A1: Ação da catalase sobre a diclorofluoresceína.....	147
FIGURA A2: Ação do formato de sódio sobre a diclorofluoresceína.....	147
FIGURA A3: Ação da superóxido dismutase sobre a diclorofluoresceína.....	148

FIGURA B1: Gráfico de distribuição pontual (<i>dot plot</i>) representativo de células coradas com anexina V-FITC e PI.....	149
---	-----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Comparação da produção de ERO pela oxidação da PD e do IAA pela HRP detectada pelo ensaio da diclorofluoresceína (DCFH) 30 minutos após o início da reação	86
TABELA 2: Dimensões celulares da linhagem MDA-MB-231 determinadas após 24 horas de tratamento com os sistemas IAA/HRP/O ₂ e PD/HRP/O ₂	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADEPT	<i>Antibody-directed enzyme prodrug therapy</i>
AT	Azul de Trypan
ATP	Trifosfato de adenosina
AV	Anexina V
CAT	Catalase
CPG ₂	Carboxipeptidase G2
DCF	2,7-diclorofluoresceína
DCFH	2,7-diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de 2,7-diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DXR	Doxorrubicina
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FS	Formato de sódio
FS	Fostatidilserina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GDEP	<i>Gene-directed enzyme prodrug therapy</i>
HO ₂ [•]	Radical hidroperoxil
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HRP C	Isoforma C da HRP
IAA	Ácido indol-3-acético
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K _m	Constante de Michaelis
LPO	Lipoperoxidação
MOI	3-metileno-2-oxindol
MTT	{brometo de[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]}
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singleto

OH^\bullet	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PD	2,4-pentanodiona
PDEPT	<i>Polymer-directed enzyme prodrug therapy</i>
PI	Iodeto de Propídeo
RO_2^\bullet	Radical peroxil
RO^\bullet	Radical alcoxil
SOD	Superóxido dismutase
SFB	Soro fetal bovino
VN	Vermelho neutro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	Câncer: definição e parâmetros epidemiológicos	24
2.2	Terapia antitumoral	26
2.3	Novas estratégias para a terapia antitumoral: o uso de pró-fármacos ativados por catálise enzimática.....	27
2.4	Terapia antitumoral ADEPT (<i>antibody-directed enzyme prodrug therapy</i>)	29
2.5	A enzima HRP e sua aplicação na terapia ADEPT	34
2.6	O sistema Ácido IAA/HRPO₂ e sua aplicação na terapia ADEPT	41
2.6.1	Ácido indol-3-acético (IAA)	41
2.6.2	Catálise do IAA pela HRP.....	42
2.7	O sistema PD/HRP/O₂ e sua aplicação na terapia ADEPT.....	46
2.7.1	2,4-pentanediona (PD)	46
2.7.2	Catálise da PD pela HRP	48
2.8	Espécies reativas de Oxigênio (ERO) e suas ações deletérias	50
2.9	Ensaio de citotoxicidade: princípios e aplicações na pesquisa de drogas antitumorais.....	52
3	OBJETIVOS	56
3.1	Objetivo geral.....	56
3.2	Objetivos específicos.....	56
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.1	Reagentes e soluções	58
4.2	Preparo das Soluções-estoque e meios de cultura.....	59
4.2.1	Tampão fosfato-salino (PBS).....	59
4.2.2	Tampão fosfato de sódio 25 mM	59

4.2.3	Solução de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH) ativada.....	60
4.2.4	Solução de Superóxido dismutase (SOD)	60
4.2.5	Solução de catalase (CAT).....	60
4.2.6	Solução de formato de sódio (FS)	61
4.2.7	Solução de Cloreto de Cádmio (CdCl_2) 20 mM	61
4.2.8	Solução de doxorubicina (DXR) 1,5 mg/mL	61
4.2.9	Solução de trabalho do corante Giemsa.....	62
4.2.10	Solução estoque de Azul de Trypan 0,4 %.....	62
4.2.11	Solução de MTT 5 g/L	62
4.2.12	Solução de Vermelho Neutro 4 g/L.....	62
4.2.13	Solução de trabalho de Vermelho Neutro 40 $\mu\text{g/mL}$	63
4.2.14	Solução extratora de álcool-ácido (1% de ácido acético em 50% de álcool etílico absoluto)	63
4.2.15	Solução estoque HRP	63
4.2.16	Meio de cultura DMEM	64
4.2.17	Meio de cultura RPMI	65
4.3	Avaliação da produção de ERO pelos sistemas PD/HRP/O_2 e IAA/HRP/O_2	65
4.3.1	Princípio do método.....	65
4.3.2	Preparo do meio reacional.....	66
4.3.3	Ação de “scavengers” na formação de ERO pelos sistemas PD/HRP/ O_2 e IAA/HRP/ O_2	66
4.4	Avaliação da citotoxicidade dos sistemas PD/HRP/O_2 e IAA/HRP/O_2....	68
4.4.1	Células.....	68
4.4.2	Obtenção de células sanguíneas	69
4.4.3	Linhagens celulares L929 e MDA-MB-231	72
4.4.4	Avaliação da citotoxicidade do sistema PD/HRP/ O_2 e IAA/HRP/ O_2 pelo Azul de Trypan	75

4.4.5	Avaliação da citotoxicidade do sistema PD/HRP/O ₂ e IAA/HRP/O ₂ pelo MTT	76
4.4.6	Avaliação da citotoxicidade dos sistemas PD/HRP/O ₂ e IAA/HRP/O ₂ pelo vermelho neutro (VN)	78
4.5	Análise microscópica das alterações morfológicas induzidas pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂.....	79
4.6	Ensaio de apoptose por citometria de fluxo	80
4.7	Análise estatística	82
5	RESULTADOS	83
5.1	Avaliação da produção de ERO pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂	83
5.2	Ação de “scavengers” sobre as ERO formadas pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA /HRP/O₂.....	86
5.2.1	Catalase	86
5.2.2	Formato de sódio.....	89
5.2.3	Superóxido dismutase	91
5.3	Avaliação da citotoxicidade dos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA /HRP/O₂.....	94
5.3.1	Leucócitos	94
5.3.2	Células L929.....	97
5.3.3	Células MDA-MB-231	100
5.4	Análise microscópica das alterações morfológicas induzidas pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O	105
5.5	Ensaio de apoptose por citometria de fluxo	113
6	DISCUSSÃO	116
7	CONCLUSÃO.....	127
8	PERPECTIVAS	128
	REFERÊNCIAS.....	129
	APÊNDICES	147

1 INTRODUÇÃO

A terapia antitumoral convencional envolve o emprego de agentes que inibem a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão do câncer. Contudo, ela apresenta alguns problemas dentre os quais se destacam a baixa concentração do agente atingida nas proximidades do tumor, os inúmeros efeitos adversos relativos a uma toxicidade sistêmica e a resistência aos quimioterápicos convencionais (BLAU et al., 2006).

Devido ao fato de apenas uma pequena porção do antineoplásico administrado atingir o sítio tumoral, é necessário fazer uso de altas doses dos mesmos para alcançar níveis elevados de morte celular, o que aumenta a incidência de efeitos adversos. Por essa razão, novas estratégias têm sido buscadas para permitir uma ação mais seletiva ou até mesmo específica sobre células tumorais reduzindo a agressão aos tecidos saudáveis e a toxicidade sistêmica, o que pode ser alcançado através do uso de anticorpos que reconhecem marcadores específicos expressos na superfície da célula tumoral (KRETZER, 2007).

A terapia ADEPT (*antibody-directed enzyme prodrug therapy*) surgiu nesse contexto, e propõe uma ação mais seletiva, reduzindo a agressão aos tecidos saudáveis e assim a toxicidade sistêmica. Ela envolve o uso de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos expressos na superfície das células tumorais, conjugados a enzimas capazes de converter pró-fármacos em fármacos ativos nas proximidades do sítio tumoral (DALMAZZO et al., 2011; DAI et al., 2012).

O complexo formado pela enzima *Horseradish peroxidase* (HRP) e ácido indol-3-acético (IAA) consiste em um sistema muito estudado para aplicação na terapia ADEPT. O IAA é uma auxina vegetal que isoladamente não apresenta toxicidade celular, porém, quando atua como substrato da HRP sofre uma descarboxilação oxidativa, na ausência de peróxido de hidrogênio, que leva a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Estas consistem em estruturas derivadas do metabolismo do oxigênio potencialmente lesivas para as células, devido a sua capacidade de promover uma lipoperoxidação dos fosfolípidos presentes nas membranas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; FOLKES; WARDMAN, 2001; GRECO; DACHS, 2001; WARDMAN, 2002; DE MELO et al., 2004).

Contudo, a oxidação do IAA pela HRP leva a geração de outros compostos, também potencialmente citotóxicos como o indol-3-metanol, indol-3-aldeído e 3-metileno-2-oxindol sendo esse altamente reativo contra nucleófilos celulares como a glutatona e grupos tióis de proteínas ou histonas (FOLKES; WARDMAN, 2001; WARDMAN, 2002).

A toxicidade do sistema IAA/HRP/O₂ foi demonstrada em muitas linhagens humanas de células tumorais, tais como carcinoma da bexiga (T24), adenocarcinoma de mama (MCF-7), carcinoma escamoso da nasofaringe, células de melanoma (G361) e câncer de pâncreas (BxPC-3) (KIM et al., 2006; DALMAZZO et al., 2011).

Outro substrato da HRP que tem sido alvo de investigações mais recentes é a 2,4-pentanediona (PD), um composto β -dicarbonílico que assim como o IAA é oxidado aerobicamente por essa peroxidase, na ausência de peróxidos, levando a produção de espécies reativas de oxigênio. Dessa forma a associação PD/HRP/O₂ pode apresentar-se como uma eficiente e promissora alternativa para a terapia ADEPT, assim como outras terapias que envolvem o uso de anticorpos ou genes ligados a enzimas (SOARES; BECHARA, 1982; RODRIGUES et al., 2006).

Os ensaios de avaliação de citotoxicidade permitem analisar os efeitos tóxicos de substâncias em culturas celulares. Para este fim, vários métodos podem ser utilizados, porém, com diferentes princípios. Alguns podem verificar a integridade da membrana celular como o Azul de Trypan e Iodeto de propídeo, outros são marcadores que verificam a funcionalidade de algumas organelas citoplasmáticas dentre os quais pode-se citar o {brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio} MTT, o vermelho neutro (VN), a fosfatase ácida (PAC), a sulforodamina B (SRB) e o cristal violeta (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Atualmente não há estudos que avaliem o efeito citotóxico do sistema PD/HRP/O₂ sobre células tumorais. Dessa forma, esse trabalho se propôs a avaliar a produção de ERO pelo sistema PD/HRP/O₂ e a citotoxicidade mediada pelo mesmo utilizando as metodologias da exclusão pelo azul de Trypan, o (MTT) e o VN, bem como a avaliação da apoptose mediada pelos produtos gerados pela oxidação da PD pela HRP, sendo estabelecida uma comparação com o sistema IAA/HRP/O₂ para assim compor uma base sólida para futuras aplicações desse sistema na terapia ADEPT.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer: definição e parâmetros epidemiológicos

O termo câncer é originado da palavra grega *Karkinos* que significa caranguejo, e foi utilizado pela primeira vez por Hipócrates (460-370 a.c) para descrever formações não-ulcerosas e ulcerosas, devido à semelhança entre o corpo do caranguejo e a aparência de um corte de tumor maligno, o qual apresentava inúmeros vasos sanguíneos ao seu redor. Posteriormente Celso (45 a. c.-50 a. c) traduziu a palavra grega *Karkinos* para o latim *câncer*, que também significava caranguejo. Galeno, mais adiante passou a utilizar o termo *carcino*, instituído por Hipócrates, para designar somente os tumores malignos, acrescentando a ele o sufixo *oma*, do grego inchaço, originando a palavra *carcinoma* (REEDY, 1975; SUDHAKAR, 2009).

No entanto, a incidência dessas patologias sobre a população é ainda mais antiga. Existem manuscritos de 1600 a. c. e 1500 a. c que relatam, respectivamente, a ocorrência de lesões em múmias características de tumores ósseos e de câncer de mama. Estudos dos fósseis do homem de Neanderthal datados de 35.000 anos a. c. permitiram revelar a presença de uma lesão em um osso do crânio muito semelhante a uma neoplasia, provavelmente um meningioma (CZARNETZKI, 1980; SUDHAKAR, 2009; DAVID; ZIMMERMAN, 2010).

Atualmente sabe-se que o câncer corresponde a um conjunto de patologias crônicas que apresentam características em comum, sugestivas de malignidade, dentre elas a alta taxa de proliferação. As células tumorais originam-se de uma única célula transformada que, diante da perda da capacidade de diferenciação, passa a multiplicar-se de forma descontrolada gerando novas células anormais (CAO et al., 2011).

O processo de transformação, designado carcinogênese, pode ser desencadeado por inúmeros fatores de caráter interno e, portanto, geneticamente pré-determinados, ou externos, que se encontram relacionados ao meio ambiente e, portanto, aos hábitos alimentares ou costumes próprios aos indivíduos, como tabagismo, exposição às radiações, fatores ocupacionais, hábitos sexuais dentre

outros. Esses fatores podem interagir de inúmeras maneiras aumentando a probabilidade de ocorrência das transformações malignas (DOLL; PETO, 1981; STARE; JOZEFOWICZ, 2008).

O câncer consiste em uma das principais causas de doença em todo o mundo. Segundo o GLOBOCAN que é um relatório da IARC (*International Agency of Research on Cancer*), um órgão da Organização Mundial da Saúde (OMS) para a estimativa da incidência, mortalidade e prevalência do câncer no mundo, em 2012 foram registrados aproximadamente 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes relacionadas a essa patologia, havendo um aumento em relação ao ano de 2008. De acordo com esse estudo, em 2012 havia 32,6 milhões de pessoas, com idade superior a 15 anos, vivendo com câncer no mundo (GLOBOCAN, 2013).

Segundo a OMS, levando em consideração as tendências em câncer apresentadas por estudos atuais, espera-se que a incidência dessa doença aumente ao longo dos anos. Estima-se que até 2025 serão registrados aproximadamente 19,3 milhões de novos casos de câncer por ano associados ao envelhecimento da população mundial. A maior parte desses casos (56,8%) e das mortes associadas ao câncer (64,9%) ocorrerá em países menos desenvolvidos (GLOBOCAN, 2013).

Quanto à incidência de câncer no Brasil, de acordo com a publicação *Estimativa 2014- Incidência de Câncer no Brasil*, lançada no dia 27 de novembro de 2013, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 580 mil novos casos de câncer para 2014. Os cânceres mais incidentes sob a população brasileira serão o de pele não melanoma (182 mil); próstata (69 mil); mama (57 mil); cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil) e estômago (20 mil) (INCA, 2013).

De acordo com esse estudo, será observado um aumento do número de novos casos de câncer comparativamente a 2013, um reflexo do envelhecimento populacional. No entanto, será observada uma redução na incidência de câncer de pulmão, em homens, e de câncer de colo de útero, o que provavelmente é atribuído ao sucesso das campanhas de controle do tabagismo e de incentivo à realização do exame de Papanicolau (INCA, 2013).

2.2 Terapia antitumoral

A escolha da opção terapêutica antitumoral a ser adotada deve levar em consideração inúmeros fatores inerentes ao tumor, como o tipo de tumor, grau de vascularização, tendência a metástases e principalmente o grau de estadiamento do mesmo, assim como características inerentes ao paciente, como o nível de comprometimento da saúde e idade (SHEIN et al., 2006).

A cirurgia foi a primeira alternativa de sucesso descoberta para o tratamento do câncer no século XVIII por John Hunter (1737-1821), o que marcou o início do “século do cirurgião”. A ideia de que a remoção cirúrgica do câncer era suficiente para promover a cura dessa patologia perdurou até a descoberta das metástases pelo cirurgião inglês Stephen Paget (1855-1926). Esse achado representou o início da compreensão do mecanismo de desenvolvimento do câncer e revelou a necessidade do uso de tratamentos sistêmicos auxiliares à cirurgia para a eliminação das células tumorais remanescentes (DOBSON, 1959; RIBATTI; MANGIALARDI; VACCA, 2006; SUDHAKAR, 2009).

O uso da quimioterapia para o tratamento do câncer teve início no século XX durante a 2ª Guerra Mundial. Atualmente existe uma ampla gama de quimioterápicos disponíveis, para o uso isolado ou em combinações como os agentes alquilantes, compostos de platina, inibidores mitóticos, antimetabólitos, agentes hormonais e modificadores da resposta imunológica (DEVITA; CHU, 2008; LIND, 2011).

Apesar dos benefícios que trazem à terapia antitumoral devido à abordagem sistêmica, essas drogas, por apresentarem elevada inespecificidade, costumam também atuar sob células normais, preferencialmente aquelas que assim como as células tumorais apresentam elevada taxa de divisão celular, ocasionando inúmeros efeitos adversos, os quais podem variar de acordo com a classe a qual a droga pertence e com a dose do fármaco administrada (CORRIE, 2007; SRIDHAR; SYMONDS, 2008). Dessa forma, as células da medula óssea, da mucosa gastrointestinal, dos folículos pilosos e das gônadas são as mais comprometidas, o que justifica os efeitos adversos mais comuns à quimioterapia como a mielossupressão e, conseqüentemente, maior susceptibilidade a infecções, náuseas, vômito, alopecia e redução da fertilidade (CORRIE, 2007).

A radioterapia é outra intervenção terapêutica muito usada no tratamento de lesões locais do câncer cuja origem data de 1960. Essa prática consiste no uso de radiação ionizante para promover a destruição das células tumorais através da introdução de quebras na fita simples e dupla do DNA, o que é mediado por elétrons excitados e radicais livres formados após a absorção da radiação pelo tecido (FALK, 2003; GWYNNE; STAFFURTH, 2012).

Entretanto, assim como na quimioterapia, as células normais presentes nas proximidades da área irradiada são atingidas gerando efeitos adversos que podem se manifestar precocemente, como eritema, descamação, alopecia, mucosite, pneumonite, destruição de células da medula óssea, náuseas e vômito; ou de forma tardia como a fibrose, necrose, mielite, telangiectasia, estenose, catarata, xerostomia, lesão neurológica e, ocasionalmente, o desenvolvimento de cânceres secundários (WARD, 2004; GWYNNE; STAFFURTH, 2012). O aparecimento desses efeitos depende da dose total da radiação administrada e de outros fatores como do tamanho do campo irradiado, do número e do intervalo entre as sessões, do fracionamento da dose e da agressão cirúrgica ou traumática do campo irradiado (CUNHA et al., 2007).

2.3 Novas estratégias para a terapia antitumoral: o uso de pró-fármacos ativados por catálise enzimática

Além da questão da toxicidade sistêmica, o tratamento antineoplásico convencional apresenta outros problemas que podem dificultar a terapia, um deles consiste na resistência desenvolvida por determinados tumores aos quimioterápicos convencionais. Esse fenômeno pode ser atribuído a fatores intrínsecos, relacionados ao indivíduo como a má absorção, rápido metabolismo e excreção da droga; ou adquiridos. Nesse último grupo se enquadra o desenvolvimento de mutações genéticas capazes de alterar a expressão de genes relacionados à codificação de proteínas que influenciam o processo de absorção, metabolismo e eliminação das drogas antitumorais a partir de cada célula tumoral, limitando a concentração do fármaco que realmente atinge o tumor (GOTTESMAN, 2002; TRÉDAN et al., 2007; HOLOHAN et al., 2013).

Essas mutações podem ainda mediar a alteração de alvos de medicamentos antitumorais assim como reduzir a sua expressão, o que também está associado ao desenvolvimento de resistência a determinados fármacos. No entanto, o próprio microambiente do tumor, devido a sua heterogeneidade, pode estar associado à proteção das células tumorais, as quais interagem com a matriz extracelular tornando-se menos sensíveis aos quimioterápicos e capazes de escapar da apoptose mediada por essas drogas (HOLOHAN et al., 2013).

A rede vascular tumoral, devido a sua organização complexa e incapaz de irrigar adequadamente o tecido tumoral, participa do processo de desenvolvimento de resistência aos principais quimioterápicos uma vez que dificulta a chegada dos fármacos ao sítio tumoral e não favorece a distribuição homogênea dos mesmos a todas as células que compõe o tumor. Além disso, estabelece um ambiente hipóxico e ácido no interior dos tumores que auxilia no estabelecimento de resistência a determinados tipos de antineoplásicos (TRÉDAN et al., 2007).

Nesse contexto, o uso de pró-fármacos e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que direcionem o agente tóxico seletivamente para a célula tumoral é uma abordagem extremamente promissora. Tal estratégia, além de poupar os tecidos normais reduzindo os efeitos adversos, permite aumentar a concentração de fármaco ativo que atinge as células tumorais e, conseqüentemente, a eficácia terapêutica, diminuindo os problemas relacionados à baixa biodisponibilidade de algumas drogas antitumorais (ROOSEBOOM, COMMANDEUR; VERMEULEN, 2004; ZAWILSKA; WOJCIESZAK; OLEJNICZAK, 2013).

Entre essas estratégias se encontra a terapia ADEPT (*antibody-directed enzyme produg therapy*), terapia pró-droga/enzima dirigida por anticorpo, na qual é usado um anticorpo monoclonal específico para antígenos presentes na superfície da célula tumoral, acoplado a uma enzima que converte um pró-fármaco inativo no fármaco ativo nas proximidades da célula tumoral. Essa terapia foi proposta em 1987 e desde então tem sido muito estudada, principalmente, com o intuito de solucionar algumas das limitações da quimioterapia convencional (MELTON; SHERWOOD, 1996; CAPUCHA et al., 2012; DALMAZZO et al., 2011; ZAWILSKA; WOJCIESZAK; OLEJNICZAK, 2013), .

2.4 Terapia antitumoral ADEPT (*antibody-directed enzyme prodrug therapy*)

O uso de anticorpos para a promoção de ação antitumoral específica foi proposto por Paul Ehlich no século XX. No entanto, a ideia se tornou mais concreta em 1975 com a descoberta dos anticorpos monoclonais e da sua obtenção através da tecnologia dos hibridomas. A partir de então, mediante os avanços na área da tecnologia de obtenção de anticorpos humanizados, tem sido observada uma maior aplicação dos anticorpos monoclonais na terapia antitumoral dirigida (MELTON; SHERWOOD, 1996; WEINER; SURANA; WANG, 2010).

A terapia ADEPT é realizada através de duas etapas (Figura 1). A primeira, que consiste na administração de um anticorpo monoclonal com afinidade para antígenos específicos expressos pelas células-alvo, conjugado a uma enzima que tem a função de converter o pró-fármaco inativo no fármaco ativo nas proximidades do sítio tumoral. A segunda etapa é representada pela administração do pró-fármaco, que se liga ao sítio catalítico da enzima que compõe o imunocomplexo enzima-anticorpo, que havia sido administrado anteriormente, e, portanto já se encontrava presente no sítio tumoral, gerando como produto o fármaco ativo no meio extracelular que então se difunde de uma célula tumoral para outra exercendo sua ação citotóxica (CHUNG et al., 2005; BLAU; MENEGON; CHUNG, 2006; SCHELLMANN et al., 2010; TIETZE; SCHMUCK, 2011).

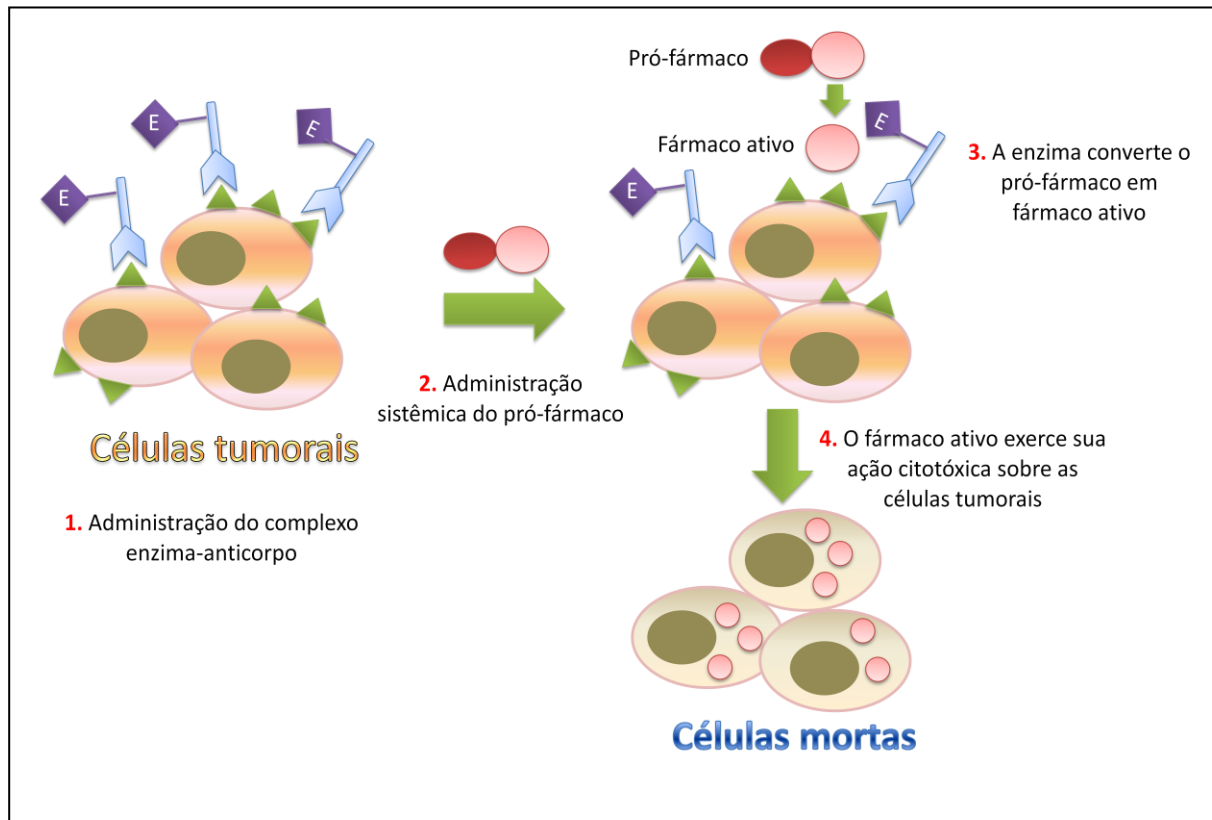


FIGURA 1: Terapia ADEPT. Em 1: o complexo enzima-anticorpo liga-se especificamente aos antígenos expressos sobre a superfície das células tumorais; em 2 o pró-fármaco é administrado e, em seguida, na etapa 3, é ativado pelo complexo enzima-anticorpo liberando o fármaco ativo que, na etapa 4, exerce a sua ação citotóxica sobre as células tumorais (Adaptado a partir de MAHATO; TAI; CHENG, 2011).

As enzimas usadas para ativar pró-fármacos através da terapia ADEPT devem apresentar elevada especificidade e, além disso, valores de constante de Michaelis-Menten (K_m) baixos para que a quantidade de enzima requerida para ativar o pró-fármaco seja reduzida. Elas podem ser classificadas quanto à origem em enzimas de origem mamífera, dentre as quais se destacam a fosfatase alcalina (AP) e a α -galactosidase (α -g); enzimas de origem não mamífera com homologia mamífera como a carboxipeptidase A, β -glicuronidase (β -g) e nitrorredutase (NR) ambas de *Escherichia coli*; e enzimas de origem não-mamífera sem homologia mamífera dentre elas a β -lactamase (β -L), carboxipeptidase G2 (CPG₂), citosina deaminase (CD); benzilpenicilina amidase (PGA) e a fenoximetilpenicilina amidase (PVA) (NICULESCU-DUVAZ; SPRINGER, 1997; CHUNG et al., 2005; BLAU; MENEGON; CHUNG, 2006; YANG et al., 2011; ZAWILSKA; WOJCIESZAK; OLEJNICZAK, 2013).

O uso de enzimas humanas, apesar de proporcionar menor imunogenicidade, pode promover inúmeros efeitos adversos devido à catálise de substratos endógenos. Assim, as enzimas mais comumente usadas na preparação dos conjugados enzima-anticorpo são as de origem bacteriana, pois apresentam uma considerável especificidade e a ativação da resposta imunológica mediada por elas pode ser controlada através de outras estratégias (BLAU; MENEGON; CHUNG, 2006; ZAFIR-LAVIE; MICHAELI; REITER, 2007; OSIPOVITCH et al., 2012).

Os anticorpos monoclonais usados nessa terapia costumam ser do tipo IgG1 e IgG2 podendo ser usadas na forma intacta ou de fragmentos, o que depende da enzima a qual eles serão conjugados, assim como dos recursos financeiros disponíveis. Os fragmentos de anticorpos que apresentam os sítios de ligação ao antígeno, como o $F(ab')_2$ e $F(ab')$, devido às menores dimensões, têm maior facilidade de atingir o sítio tumoral. No entanto, são depurados mais rapidamente, o que pode comprometer o sucesso da terapia uma vez que pode não permitir o acúmulo de conjugados enzima-anticorpo em níveis suficientes no sítio tumoral (BAGSHAWE et al., 1994; NICULESCU-DUVAZ; SPRINGER, 1997; CHUNG et al., 2005).

Quanto ao pró-fármaco, esse deve atuar como um substrato apropriado para a enzima que compõe o conjugado enzima-anticorpo, não deve ser catalisado por enzimas endógenas e deve apresentar menor toxicidade quando comparado à droga ativa. Além dessas características, deve apresentar estabilidade em pH fisiológico e elevada lipofilicidade para que possa ultrapassar as barreiras fisiológicas e atingir o sítio tumoral. Inicialmente, os pró-fármacos adotados consistiam em derivados de fármacos antitumorais já conhecidos, devido ao fato de seus parâmetros farmacocinéticos encontrarem-se bem caracterizados. De qualquer forma, a escolha de um pró-fármaco que produza, mediante catálise enzimática, um fármaco tóxico deve levar em consideração a sua relação estrutura-atividade (BAGSHAWE et al., 1994; NICULESCU-DUVAZ; SPRINGER, 1997; BLAKEY et al., 1995).

O primeiro estudo clínico envolvendo a terapia ADEPT foi desenvolvido nos anos 1990, tomando como base estudos preliminares *in vivo* (BAGSHAWE et al., 1988; BAGSHAWE, 1995; MARTIN et al., 1997). Dessa forma, foram utilizados anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno carcinoembriogênico (CEA) conjugados a enzima CPG₂, sendo essa responsável pela conversão do pró-fármaco o CMDA (4 -[(2-cloroetil) (2-mesiloxietil)amino]benzoil-L-glutâmico), também

conhecido como CJS8, no fármaco ativo CJS11 (ácido 4-[(2 cloroetil) (2-mesiloxietil)amino]benzóico) (BAGSHAWE et al., 1994; BAGSHAWE, 1995). Os pacientes que receberam a terapia tinham carcinoma colorretal avançado tratado com cirurgia e não responsivo à quimioterapia convencional com 5-fluorouracil e ácido folínico e apresentaram uma redução de 50% da massa tumoral (BAGSHAWE et al., 1994; BAGSHAWE, 1995; MARTIN et al., 1997).

Esses estudos clínicos iniciais, além de evidenciarem a ação da terapia ADEPT, também permitiram detectar as principais limitações dessa estratégia antitumoral. Uma delas consiste no elevado tempo de meia-vida dos fármacos ativos usados, o que não é viável, uma vez que permite a sua difusão para outros órgãos sadios distantes do sítio tumoral, e predispõem o aparecimento de efeitos adversos. Foi também observado que esse complexo enzima-anticorpo induz imunogenicidade e, portanto, a ativação do sistema imunológico proveniente do não reconhecimento do conjugado enzima-anticorpo pelo organismo (BAGSHAWE et al., 1988; BAGSHAWE, 1995; BAGSHAWE et al., 1995).

Devido ao risco do desenvolvimento de reações imunogênicas os estudos posteriores inicialmente limitaram o número de ciclos dessa terapia. Contudo, devido à vascularização complexa e ineficiente dos tumores, a administração de poucos ciclos comprometeu a eficiência da terapia por dificultar a distribuição homogênea do conjugado para todas as células tumorais. Diante disso, novas tentativas foram realizadas sendo administrados concomitantemente com a terapia ADEPT imunossupressores como a ciclosporina, o que retardou o aparecimento dos anticorpos dirigidos contra o conjugado enzima-anticorpo e permitiu a administração de mais ciclos da terapia (BAGSHAWE et al., 1995; SHARMA, 1996).

A resolução da imunogenicidade, que ainda representa a principal limitação dessa terapia, tem sido buscada através de diferentes abordagens. O desenvolvimento e utilização de formas mutantes de enzimas humanas em substituição às enzimas bacterianas e demais enzimas não humanas usadas na terapia ADEPT permite reduzir as reações imunológicas desencadeadas por elas sem haver, no entanto, toxicidade sistêmica mediada pela ativação de substratos endógenos (XU; McLEOD, 2001; BLAU; MENEGON; CHUNG, 2006).

A tecnologia do DNA recombinante tem permitido produzir anticorpos humanizados cuja região variável da cadeia leve (VL) e da cadeia pesada (VH), responsáveis pelo reconhecimento e interação com os antígenos expressos pelas

células tumorais, sejam não humanas e a porção constante da cadeia leve (CL) e pesada (CH), também denominadas porção Fc, provenientes de anticorpos humanos (BLAU; MENEGON; CHUNG, 2006).

Uma alternativa disponível para evitar a imunogenicidade consiste na produção de anticorpos humanizados catalíticos, designados abzymas, capazes de reconhecer antígenos tumorais e assim como as enzimas catalisarem uma variedade de reações químicas. No entanto, apesar desses anticorpos apresentarem uma maior especificidade para os substratos, alguns deles tem uma menor atividade catalítica quando comparados as enzimas utilizadas na terapia ADEPT (JONES; WENTWORTH JÚNIOR, 2001; ALI et al., 2009; TIETZE; SCHMUCK, 2011).

A terapia ADEPT apresenta outras desvantagens além da ativação do sistema imunológico e do seu elevado custo. Uma delas consiste na dificuldade de caracterização de antígenos expressos especificamente pelas células tumorais, o que dificulta a obtenção dos anticorpos monoclonais. Outra reside no elevado intervalo de tempo que deve ser realizado entre as duas etapas para garantir que os conjugados enzima-anticorpo presentes na circulação sejam depurados antes da administração do pró-fármaco e, portanto, impedir a sua ativação indesejável. Esse intervalo pode ser reduzido através da administração de um segundo anticorpo galactosilado com afinidade para o sítio catalítico da enzima que compõe o conjugado enzima-anticorpo, promovendo a inativação daqueles que permaneceram na circulação sem, no entanto, comprometer a ação dos conjugados retidos nos tumores (BAGSHAWE et al., 1988; BAGSHAWE et al., 1995; MELTON; SHERWOOD, 1996; XU; McLEOD, 2001; BLAU; MENEGON; CHUNG, 2006).

A liberação do fármaco ativo a partir das células tumorais mortas também consiste em uma desvantagem dessa terapia uma vez que predispõem a ação do fármaco sobre células normais. No entanto, para contornar esse problema, pesquisas têm sido realizadas no intuito de desenvolver pró-fármacos que dêem origem a fármacos com tempo de meia-vida reduzidos (CHUNG et al., 2005).

Apesar das limitações apresentadas, a terapia ADEPT consiste em uma boa alternativa para a terapia antitumoral uma vez que promove a morte celular tumoral dirigida e permite a administração de fármacos antitumorais potentes e já consagradas sob a forma de pró-fármacos. O fármaco ativo gerado no meio extracelular apresenta um menor peso molecular, o que permite a sua difusão através dos tumores sólidos, podendo inclusive atuar sobre células tumorais que não

apresentam o antígeno ao qual o conjugado está dirigido, o que é designado “efeito espectador”. A amplificação do efeito citotóxico pela catálise de várias moléculas do substrato por um único conjugado enzima-anticorpo representa outro benefício proporcionado por essa estratégia terapêutica frente à administração de anticorpos ligados diretamente aos fármacos e é importante para solucionar a resistência às drogas antitumorais convencionais (ROOSEBOOM; COMMANDEUR; VERMEULEN, et al., 2004; CHUNG et al., 2005; TIETZE; SCHMUCK, 2011; CAPUCHA et al., 2012).

Existem várias combinações de enzimas e pró-fármacos para aplicação na terapia ADEPT em fase de desenvolvimento. Dentre essas, a constituído pela enzima *Horseradish peroxidase* (HRP) e seu substrato o ácido indol-3-acético (IAA) se destaca, uma vez que sua toxicidade foi demonstrada em diferentes linhagens tumorais, como em células de carcinoma de bexiga T24, adenocarcinoma de mama MCF-7, carcinoma espinocelular nasofaríngeo FaDu, melanoma G361 e câncer pancreático BXPC-3 (FOLKES; WARDMAN, 2001; GRECO et al, 2001; WARDMAN, 2002; DE MELO et al., 2004; DALMAZZO et al., 2011). Diante disso, e levando em consideração a capacidade de alguns compostos β -dicarbonílicos de serem, assim como o IAA, oxidados pela enzima HRP, na ausência de peróxidos, tem sido estudada a possibilidade de utilização desses compostos na terapia ADEPT (RODRIGUES et al., 2006; RODRIGUES, 2007).

2.5 A enzima HRP e sua aplicação na terapia ADEPT

A *Horseradish peroxidase* (HRP) E.C. 1.11.1.7, ou peroxidase de raiz forte, recebe essa designação por ser extraída a partir da *Amoracia rusticana* também conhecida popularmente como rábano ou raiz forte. Essa planta é comumente cultivada em regiões temperadas, sendo muito usada na culinária, como tempero e na produção de molhos (VEITCH, 2004; MOHAMED et al., 2013).

A HRP é uma glicoproteína que assim como as demais peroxidases são oxirredutases que catalisam reações de óxido-redução, oxidando substratos orgânicos e inorgânicos como mono, di, poli e aminofenóis, aldeídos, aminas aromáticas, necessitando geralmente de peróxido, como o peróxido de hidrogênio

ou o perborato, para desempenhar a sua ação catalítica (FATIBELLO FILHO; VIEIRA, 2002; HOWES, et al., 2005).

As peroxidases podem ser classificadas quanto à origem em peroxidases de origem bacteriana, animal, fúngica e de plantas, assim como quanto à presença do grupo heme, e nesse caso são designadas peroxidases hêmicas quando esse grupo encontra-se presente, e não-hêmicas quando o mesmo encontra-se ausente. A enzima HRP pertence à superfamília das peroxidases vegetais sendo também classificada como hemeperoxidase devido à presença do grupamento ferroprotoporfirina IX como grupo prostético o qual é ligado covalentemente à porção protéica da enzima (VEITCH, 2004).

A descoberta da ação enzimática da HRP foi realizada por volta de 1810, por Louis Antonie Planché (1776-1840) através da observação da mudança de cor de uma tintura de *Guaiacum officinale* e *G. sanctum* após a adição de um pedaço de raiz forte. Existem inúmeras isoformas da enzima HRP presentes na raiz da planta *A Armoracia rusticana*, porém a forma HRP-C é a que mais se destaca por ser a mais abundante. A estrutura dessa isoenzima foi descrita em 1976. Ela apresenta massa molar entre 40000 g/mol^{-1} e 45000 g/mol^{-1} e é constituída por um único polipeptídeo cuja sequência contém 308 aminoácidos que corresponde a 33890 g/mol^{-1} da massa molar total da enzima. Contém ainda um grupo prostético heme também designado ferroprotoporfirina IX, dois átomos de cálcio e oito cadeias laterais neutras de carboidratos ligadas à enzima por meio de resíduos de asparagina (WELINDER, 1976; BERGLUND et al., 2002; VEITCH, 2004).

Cada um dos dois átomos de cálcio está disposto em um domínio diferente da enzima compondo dois domínios similares que conferem um ambiente hidrofóbico no qual o grupo heme se insere (Figura 2) (VEITCH, 2004).

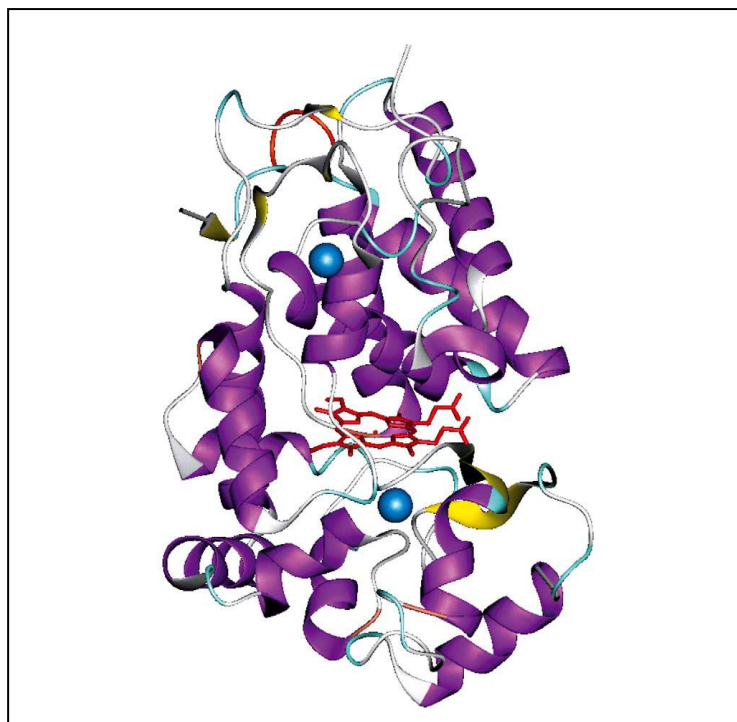
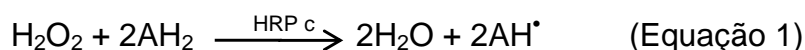


FIGURA 2: Representação tridimensional da isoforma C da enzima HRP. O grupo heme (vermelho) encontra-se localizado entre os dois domínios da enzima, cada um contendo um átomo de cálcio (esferas azuis). As regiões α -helicoidais e β -folha são apresentadas na cor roxa e amarela, respectivamente (VEITCH, 2004).

As reações catalisadas pela HRP-C e por outras isoformas da HRP podem ser expressas pela equação 1, na qual os termos AH_2 e AH^\bullet correspondem à forma reduzida e oxidada do substrato respectivamente (VEITCH, 2004).



A HRP-C apresenta no seu sítio catalítico o grupo ferroprotoporfirina IX, também chamado grupo heme, que apresenta um átomo de ferro (III) na posição central ligado a quatro átomos de nitrogênio presentes nos anéis pirrólicos nas posições I, II, III e IV e ligado de forma covalente a uma cadeia lateral imidazólica de um resíduo de histidina na posição V. A posição VI na enzima no estado nativo está livre. O grupo heme apresenta oito cadeias laterais representadas por quatro grupos metil, dois grupos vinil e dois grupos propionato. Essa formação é essencial para a manutenção da estrutura da enzima assim como da sua integridade funcional (Figura 3) (DUNFORD, 1999; VEITCH, 2004).

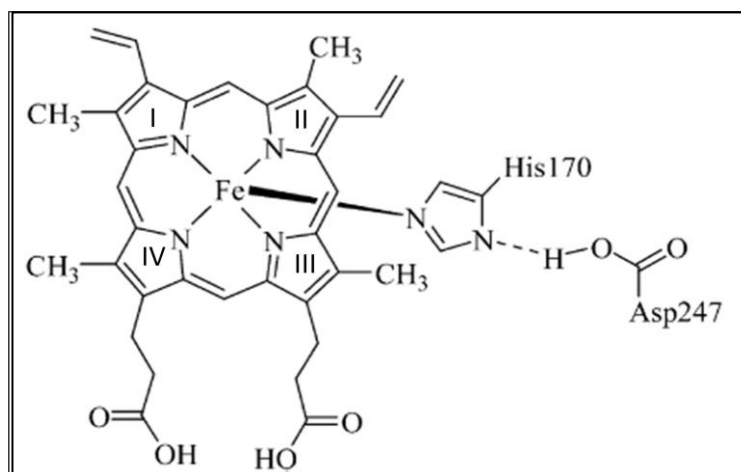


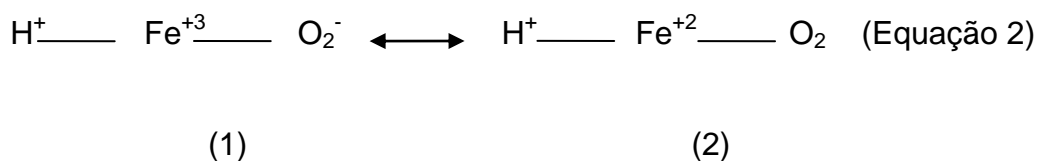
FIGURA 3: Grupo heme ou ferroprotoporfirina IX da HRP (VEITCH, 2004).

A ação catalítica da HRP ocorre normalmente na presença hidroperóxidos, o que caracteriza a via clássica de oxidação dos substratos. No entanto, alguns substratos como o dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADH), diidrofumarato, o IAA e a PD podem ser oxidados através da via alternativa, a qual ocorre na ausência de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FOLKES; WARDMAN, 2001; RODRIGUES et al. 2006) (Figura 4).

Na via clássica um hidroperóxido orgânico, como o peróxido de hidrogênio, atua como acceptor de elétrons sendo reduzido durante a oxidação da HRP do seu estado fundamental ao estado de composto I. Essa reação ocorre com a transferência de um oxigênio do peróxido de hidrogênio para o grupo heme da enzima, que apresenta no seu estado de repouso o átomo de ferro no estado de oxidação III (Fe^{3+}), o qual é oxidado ao estado de oxidação IV (Fe^{4+}) (Figura 4- reação (1)). A HRP na forma de composto I promove a oxidação e, portanto a abstração de um elétron de um substrato redutor, sendo reduzida ao composto II. O elétron fica retido no anel porfirínico que mantém o átomo de ferro no estado de oxidação IV (Fe^{4+}) (Figura 4- reação (2)). Em mais uma etapa monoelétrica da qual participa outra molécula do substrato doador de elétrons, o composto II é convertido na forma fundamental da enzima. A perda de um elétron pelo substrato é acompanhada pela perda de um próton levando à produção de um radical cuja elevada reatividade representa uma limitação para a determinação dos produtos

gerados pela ação catalítica das peroxidases (Figura 4- reação (3)) (BERGLUND et al., 2002; VEITCH, 2004; NAVES, 2008; SILVA, 2010).

Quando há excesso de H_2O_2 pode haver a inibição do ciclo catalítico normal da HRP que é convertida ao estado de composto III que é caracterizado por ser um complexo entre o íon férrico e o ânion superóxido que pode apresentar-se em duas formas (Equação 2):



O composto III pode ser gerado através de outras vias dentre as quais se podem citar a reação entre a HRP nativa e o ânion superóxido (Figura 4- reação (6)) ou a reação entre a forma ferrosa da HRP, produzida através da via catalítica alternativa, e o oxigênio (Figura 4- reação (5)) (DUNFORD, 1999; VEITCH, 2004).

Em situações em que não há peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no meio, a oxidação dos substratos pela HRP é realizada através da via alternativa. Nesta a enzima é capaz de oxidar seus substratos, que são fortes doadores de elétrons, passando do estado de repouso Fe^{3+} ao estado reduzido Fe^{2+} , também chamado forma ferrosa (Figura 4- reação (4)). Na presença de oxigênio a enzima é então convertida à forma de composto III pela oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} (Figura 4- reação (5)) (BERGLUND et al., 2002; VEITCH, 2004; NAVES, 2008).

Apesar dos mecanismos de oxidação dos substratos pela HRP através das vias clássica e alternativa estarem bem elucidados, a cinética das reações não é bem conhecida, o que é atribuído ao fato dos produtos das reações de oxidação serem geralmente espécies altamente reativas que sofrem polimerizações com estequiometria imperfeita e com elevada velocidade, dificultando a determinação dos parâmetros cinéticos das reações (DUNFORD, 1999; NAVES, 2008).

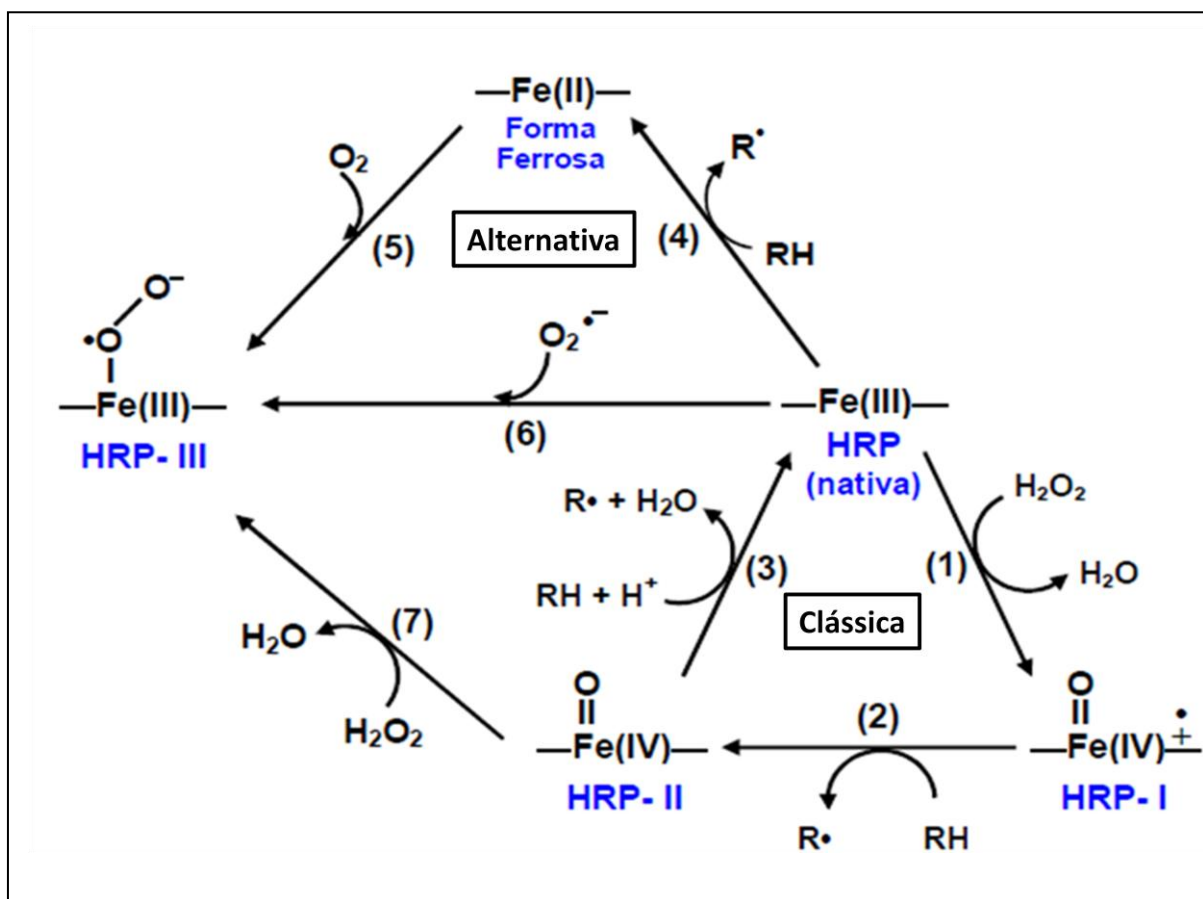


FIGURA 4: Representação esquemática da ação catalítica da HRP. Na via clássica (1-3) ocorre a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (1), um dos oxigênios deixa a moléculas de H_2O_2 na forma de água enquanto o outro permanece retido no grupo heme. A enzima, uma vez oxidada, passa da forma nativa (Fe^{3+}) para a forma de composto I (Fe^{4+}). O composto I é reduzido ao composto II (2) na presença de fortes doadores de elétrons, e retorna à forma nativa através da oxidação de uma nova molécula de substrato (3). Na via alternativa (4-6) a enzima HRP é reduzida (4) à forma ferrosa na presença de doadores fortes de elétrons que são então oxidados. Posteriormente a enzima é oxidada à forma de composto III na presença de oxigênio (5). A formação do composto III também pode ocorrer através de outras vias representadas nas reações de 6 e 7 (Adaptado de DUNFOR, 1999; BERGLUND et al., 2002).

A HRP tem uma elevada estabilidade térmica sendo também estável na faixa de pH entre 5,0 e 9,0. O seu ponto isoeletrônico é próximo ao pH 7,2, e a faixa de pH entre 6,0 e 6,5 é considerada ótima para sua ação. Essa enzima desempenha inúmeras funções fisiológicas nos vegetais dentre as quais se podem destacar o metabolismo do ácido indol-3-acético, a lignificação, a reticulação de polímeros da parede celular, formação de suberina e resistência à infecção (VEITCH, 2004).

Além dessas funções fisiológicas desempenhadas pela enzima, ela também apresenta outras aplicações que a tornam importante economicamente e que contribuem para o estímulo à sua produção. Dentre essas aplicações se destacam o uso na biodegradação de efluentes na indústria de papel e celulose, a aplicação na

oxidação de compostos fenólicos na indústria petrolífera, assim como no desenvolvimento biossensores para determinação de peróxido de hidrogênio, glicose, etanol e marcadores tumorais além do uso com fins analíticos como componente de kits de diagnóstico clínico e de imunoenaios como o ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (BIDWEL et al., 1976; MAEDA; FUJIHARA; IKEDA, 2002; RAZOLA et al., 2002; CHAIRAM; BUDDHALEE; AMATATONGCHAI, 2013; MOHAMED et al., 2013).

Atualmente tem sido estudada a aplicação da HRP na terapia antitumoral através das estratégias ADEPT (*Antibody-directed enzyme prodrug therapy*) e GDEPT (*Gene-directed enzyme prodrug therapy*). Esta última é caracterizada pela administração, através de vetores não virais como lipossomas, de um gene que codifica uma enzima ativadora de pró-fármacos no interior das células tumorais, seguido pela administração sistêmica do pró-fármaco que é convertido no fármaco ativo no meio intracelular por catálise enzimática. A substância mais utilizada nos estudos clínicos como pró-fármaco e substrato da HRP é o ácido indol-3-acético (IAA), devido a sua baixa toxicidade e capacidade de gerar compostos tóxicos após ser oxidado pela HRP. No entanto já foi evidenciada a ativação de outras pró-drogas pela HRP como a elipticina e os derivados halogenados do IAA, dentre eles o 6-cloro-IAA (FOLKES; WARDMAN, 2001; FOLKES; ROSSITER; WARDMAN, 2002; KIM et al., 2004; POLJAKOVÁ et al., 2005).

Uma maneira de compreender o mecanismo de ação da HRP e evidenciar a ação catalítica da enzima sobre o substrato consiste no uso de técnicas espectroscópicas como a espectroscopia óptica ou Raman, ressonância magnética nuclear dentre outras. Durante catálise, a HRP pode apresentar-se sob a forma nativa, composto I, composto II e composto III, as quais apresentam características diferentes, incluindo espectrofotométricas (BERGLUND et al., 2002; MAEDA; FUJIHARA; IKEDA, 2002; HOWES et al., 2005).

A enzima HRP na forma nativa apresenta um pico máximo da banda Soret em torno de 403 nm, o que é uma característica importante para a sua identificação. Quando a enzima passa para o estado de composto I, o pico máximo de absorção na região da banda Soret decresce pela metade (Figura 5). O composto II que tem maior estabilidade quando comparado ao composto I é mais facilmente caracterizado e tem como característica espectroscópica o deslocamento e aumento do pico de absorção máxima da banda Soret para a faixa de 420 nm. O composto II

também é caracterizado pela presença de duas bandas na região do visível em 527 e 554 nm. Por último, o composto III apresenta um deslocamento do pico de absorção máxima da banda Soret para 417 nm e o deslocamento da banda dupla presente na região do visível para 544 nm e 580 nm aproximadamente (BERGLUND et al., 2002; MAEDA; FUJIHARA; IKEDA, 2002; RODRIGUES et al., 2006).

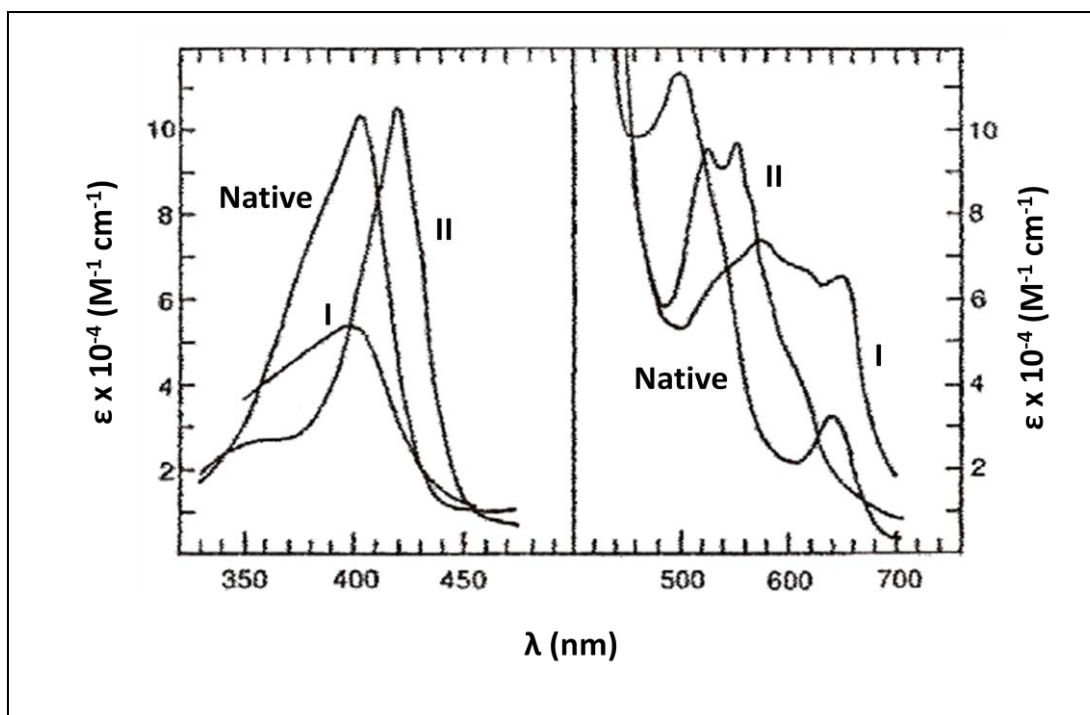


FIGURA 5: Espectro UV-Vis da *Horseradish Peroxidase* nas suas diferentes formas: estado fundamental (native) composto I e compoto II (adaptado de DUNFORD, 1999).

2.6 O sistema IAA/HRP/O₂ e sua aplicação na terapia ADEPT

2.6.1 Ácido indol-3-acético (IAA)

O ácido Indol-3-acético (IAA) (Figura 6) é um metabólito do aminoácido triptofano produzido largamente em vegetais assim como alguns microorganismos. Atua como uma auxina, hormônio de crescimento vegetal relacionado ao alongamento celular, à produção de gemas apicais e laterais assim como à

formação das raízes, frutos e folhas (GORDON; BARR; FRY, 1972; MILLS; FINLAY; HADDAD, 1991).

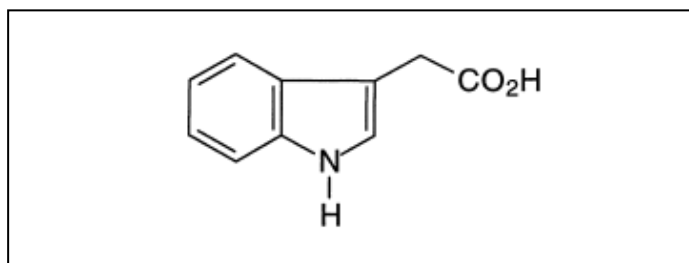


FIGURA 6: Estrutura química do ácido indol-3-acético (IAA)

Os níveis de IAA em vegetais são controlados a fim de equilibrar as atividades de biossíntese, metabolismo, transporte e o próprio crescimento dessas espécies. Assim, a metabolização do IAA pode ocorrer através da descarboxilação oxidativa catalisada por peroxidases, que tem como principais produtos o 3-metilenoxindol, 3-hidroximetilenoxindol, indol-3-aldeído e indol-3-metanol; ou por meio de oxidação não descarboxilativa, a qual leva à formação de oxindol-3-acético como principal produto (PUGINE, 2008; VAZ, 2012).

2.6.2 Catálise do IAA pela HRP

O IAA não apresenta atividade citotóxica considerável sendo bem tolerado em seres humanos, além disso, normalmente não é metabolizado por peroxidases endógenas. No entanto, estudos recentes têm mostrado que o IAA pode atuar como um novo e promissor agente terapêutico para o emprego na terapia antitumoral (FOLKES; WARDMAN, 2001; GRECO et al., 2001; WARDMAN, 2002; DE MELO et al., 2004; PUGINE et al., 2010; DALMAZZO et al., 2011; DAI et al., 2012).

A ação citotóxica dessa auxina está relacionada à sua oxidação pela enzima HRP, a qual pode ocorrer através da via clássica dependente de peróxidos, ou por meio da via alternativa, que é independente de hidroperóxidos, mas necessita de

oxigênio e leva à conversão da enzima à forma de composto III (METODIEWA; DUNFORD, 1989).

O mecanismo de oxidação do IAA pela HRP é extremamente complexo e não foi totalmente elucidado (PUGINE et al., 2010). Sabe-se que leva a formação do cátion indol-3-acetato (Figura 7- composto 1), que atua como iniciador do processo, e culmina na produção de espécies altamente reativas dentre elas algumas ERO, como o H_2O_2 ; os radicais indolil (Figura 7- composto 2); escatolil (Figura 7- composto 3) e o peroxil (Figura 7- composto 4), além do 3-metileno-2-oxindol (MOI) (Figura 7- composto 5). Este último é um dos principais responsáveis pela citotoxicidade mediada pela oxidação do IAA, uma vez que é altamente reativo contra nucleófilos celulares como histonas, grupos tióis de algumas proteínas e bases nitrogenadas do DNA (FOLKES; WARDMAN, 2001; WARDMAN, 2002, PUGINE et al., 2010). Dessa forma, a citotoxicidade mediada por esses produtos aliada ao fato do substrato ser catalisado pela enzima HRP, mesmo na ausência de hidroperóxidos, torna viável a sua aplicação na indução de morte tumoral através da terapia ADETP (DE MELO et al., 1998; DE MELO et al., 2004; KIM et al., 2006; DAI et al., 2012).

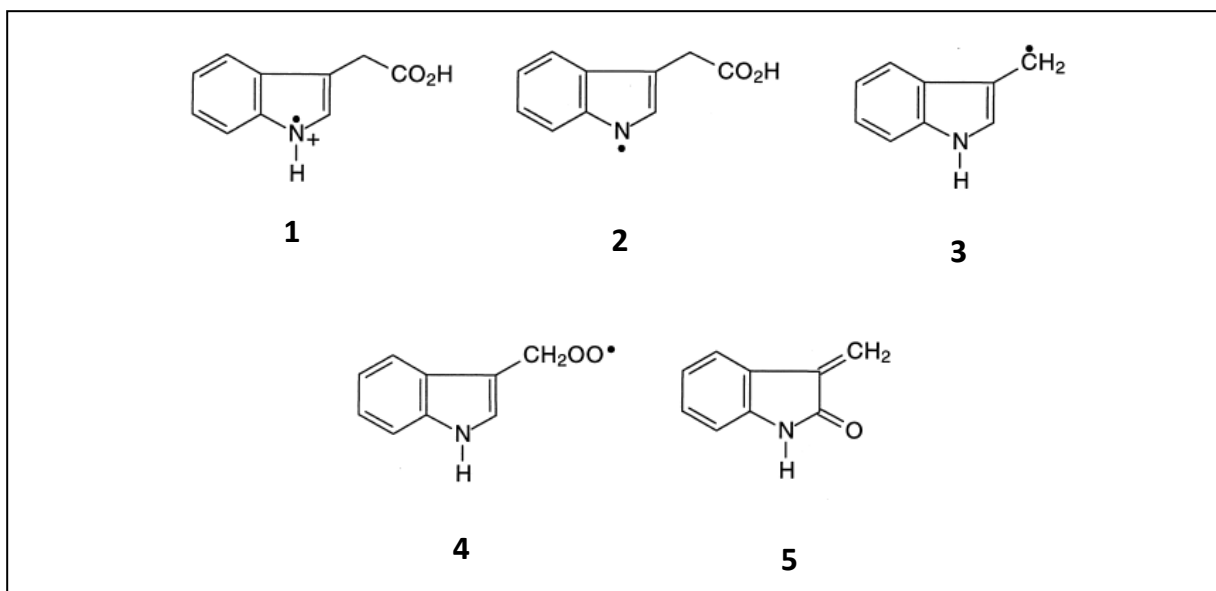


FIGURA 7: Principais produtos formados na oxidação do IAA pela HRP. (1) cátion indol-3-acetato, (2) radical indolil, (3) radical escatolil, (4) radical peroxil, (5) 3-metileno-2-oxindol (Adaptado de FOLKES; WARDMAN, 2001).

Essa capacidade de catalisar alguns substratos mesmo na ausência de hidroperóxidos não é apresentada por todas as peroxidases, algumas peroxidases fúngicas, por exemplo, não apresentam essa característica. Assim o uso da HRP para compor os conjugados enzima-anticorpo a serem usados na terapia ADEPT torna-se compensador (SAVITSKY et al., 1999; SONI, 2012).

Outras vantagens inerentes ao sistema IAA/HRP/O₂ consistem na espontaneidade com que as reações ocorrem em pH fisiológico, apesar de serem mais eficientes em meios mais ácidos, e a possibilidade de serem processadas em ambientes com menor tensão de oxigênio, uma vez que o sítio tumoral costuma apresentar-se hipóxica. Dessa forma, a manutenção da capacidade catalítica da enzima em ambientes com baixo suprimento de oxigênio corrobora para adoção desse sistema na terapia antitumoral dirigida (FOLKES; WARDMAN, 2001).

Estudos envolvendo o emprego do sistema composto pela HRP e seu substrato o IAA permitiram evidenciar a citotoxicidade mediada pelos produtos gerados na descarboxilação oxidativa do IAA em diferentes linhagens celulares, tais como: células de câncer de mama MCF-7, câncer de cólon HT29, melanoma humano G361, células NB4, células derivadas de leucemia promielocítica aguda (LPA), células provenientes de câncer de pâncreas (BXPC-3) e células provenientes de câncer de cabeça e pescoço (FOLKES; WARDMAN, 2001; KIM; JEON; PARK, 2004; TUPPER et al., 2004; HUANG et al., 2005; DALMAZZO et al., 2011).

Esses estudos também possibilitaram a descoberta de novos produtos gerados durante a catálise do IAA pela HRP dentre os quais se encontram as espécies reativas de oxigênio (ERO), como o H₂O₂, que está associado à ativação da apoptose pela via intrínseca e extrínseca. Contudo alguns estudos têm associado a citotoxicidade induzida por esse sistema a fatores que vão além da lipoperoxidação (FOLKES; WARDMAN, 2001; LIMA; ABDALLA, 2001; KIM; JEON; PARK, 2004; KIM et al., 2006).

Os resultados promissores apresentados para o sistema IAA/HRP/O₂ têm motivado o desenvolvimento de derivados do IAA, como os obtidos por halogenação, que assim como o IAA são bem tolerados pelo organismo humano e funcionam como bons substratos para a HRP. Pesquisas realizadas nessa área evidenciaram que a adição de grupos receptores de elétrons no anel aromático do IAA promove uma redução na taxa de oxidação do IAA pela HRP, mas aumenta a

citotoxicidade dos compostos gerados por essa oxidação (FOLKES et al., 2002; ROSSITER et al., 2002; WARDMAN et al., 2005; SONI, 2012).

O sistema IAA/HRP/O₂ também tem sido eficientemente empregado na terapia PDEPT (*Polymer-directed enzyme prodrug therapy*) e GDEPT (*Gene-directed enzyme prodrug therapy*). A terapia PDEPT, pró-droga/enzima dirigida por polímero utiliza um pró-fármaco polimérico que é ativado por uma enzima também conjugada a um polímero. Apesar dos benefícios dessa terapia relacionados à redução da imunogenicidade e aumento da entrada e do tempo de permanência do pró-fármaco e da enzima poliméricos no sítio tumoral, tem apresentado limitações como a redução da atividade enzimática do conjugado HRP-polímero e o aumento da sua taxa de captação pelo fígado (FOLKES; WARDMAN, 2001).

A aplicação do sistema IAA/HRP/O₂ na terapia GDEPT também tem trazido resultados animadores. Estudos que avaliaram a ação citotóxica desse sistema em linhagens tumorais de carcinoma de bexiga (T24), adenocarcinoma de mama (MCF-7) e carcinoma de nasofaringe (FaDu) relataram uma taxa de morte celular entre 70% e 90% quando apenas 5% das células expressavam o gene codificador da enzima HRP, o que demonstra um forte efeito espectador, que também foi evidenciado para o derivado halogenado do IAA, o ácido 5-bromo-indol-3-acético, em células FaDu (GRECO, et al., 2000; GRECO et al., 2001; TUPPER et al., 2010).

Estudos recentes que avaliaram a ação do sistema em questão na terapia dirigida por gene aplicada em modelos *in vitro* e *in vivo* de hepatomas permitiram evidenciar a morte de células tumorais utilizando o ensaio do {brometo de[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (MTT), assim como a redução do crescimento dos xenoinxertos presentes em ratos tratados com o plasmídeo expressando o gene para a codificação da HRP-C e o IAA (DAI et al., 2012).

A ação tóxica do sistema IAA/HRP/O₂ foi também observada em microorganismos como *Prototheca zopffi* e *Staphylococcus aureus*. Estudos envolvendo essas duas espécies mostraram uma significativa redução, proporcional ao tempo de incubação, na formação de colônias e na viabilidade celular, provavelmente devido à perda da integridade de membrana e conseqüente despolarização da mesma, o que se deu de modo independente de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido. Esse resultado comprova que o processo de citotoxicidade mediado pela oxidação do IAA pela HRP está associado à produção

de vários compostos tóxicos e não somente à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (CUNHA et al., 2010; PUGINE et al. 2010).

Dessa forma a associação IAA/HRP/O₂ tem se apresentado vantajosa para o uso em terapias ADEPT e outras que também fazem uso de anticorpos, genes ou polímeros associados a enzimas. No entanto, esse complexo ainda precisa ser estudado para que se possa elucidar com mais clareza os mecanismos através dos quais essas reações ocorrem.

2.7 O sistema PD/HRP/O₂ e sua aplicação na terapia ADEPT

2.7.1 2,4-pentanodiona (PD)

Além do IAA alguns compostos β -dicarbonílicos também têm a capacidade de serem oxidados pela *Horseradish peroxidase* (HRP) de modo independente de peróxido de hidrogênio, através de uma reação cuja cinética é muito semelhante à da oxidação do IAA pela HRP, o que motivou a investigação desses compostos para uma possível aplicação na terapia ADEPT como substrato da HRP (AUGUSTO; BECHARA, 1980; RODRIGUES et al., 2007).

Os compostos β -dicarbonílicos (Figura 8) são agentes altamente versáteis que apresentam estruturalmente dois grupos carbonila separados por um átomo de carbono intermediário, o qual está ligado a hidrogênios que apresentam uma acidez consideravelmente alta, o que justifica a facilidade com que são removidos da molécula quando esses compostos reagem, por exemplo, com uma base alcóxido, o que leva a formação de um enolato (SOLOMONS; FRYHLE, 2001).

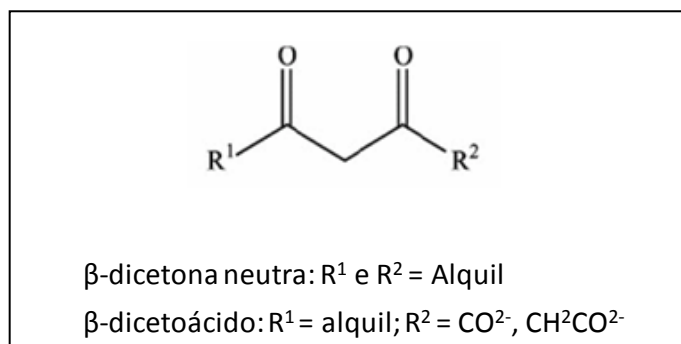


FIGURA 8: Estrutura química dos compostos β -dicarbonílicos.

De acordo com a natureza dos grupos substituintes são classificados em β -dicetonas neutras, quando os grupos R^1 e R^2 são grupos alquil e β -dicetoácidos quando o R^1 é um grupo alquil e R^2 é um carboxilato (GROGAN, 2005).

Dentre esses compostos, a PD ($\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_8$) tem se destacado uma vez que atua como um bom doador de prótons para cicloperoxidases que são enzimas que pertencem à mesma subclasse da HRP, o que juntamente com os resultados preliminares obtidos por RODRIGUES et al. (2006) que avaliaram os parâmetros químicos inerentes à oxidação da PD pela HRP, motivaram a realização do presente trabalho (TEIXEIRA et al., 1999; RODRIGUES et al., 2006).

Estudos preliminares evidenciaram que a HRP, mesmo na ausência de peróxido de hidrogênio, é capaz de promover a auto-oxidação da PD, o que ocorre de forma muito específica, uma vez que outros compostos β -dicarbonílicos como o dimedon e o acetoacetato não foram oxidados nessa situação. A catálise da PD pela HRP levou a formação de ERO detectadas pela técnica de quimiluminescência assim como outros compostos conhecidamente citotóxicos como o metilglioxal, os quais apresentaram-se tóxicos frente a neutrófilos em um ensaio preliminar para a avaliação da viabilidade celular pelo azul de Trypan (RODRIGUES et al., 2006).

A PD, popularmente conhecida como acetoacetona, é uma molécula pequena (Figura 9) que como os demais compostos β -dicarbonílicos é produzida durante o metabolismo microbiano e existem em duas formas tautoméricas, enólica e cetônica, que se convertem uma na outra rapidamente de acordo com a temperatura e o solvente utilizado. Solventes apolares costumam beneficiar a forma enólica, ao passo que solventes polares estimulam a conversão na forma cetônica que é a mais estável termodinamicamente (SOLOMONS; FRYHLE, 2001).

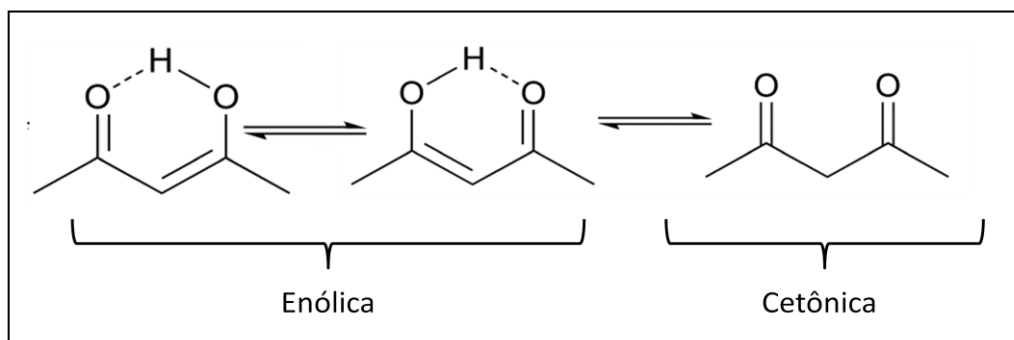


FIGURA 9: Representação da tautomeria da 2,4-pentanediona

2.7.2 Catálise da PD pela HRP

A oxidação de compostos carbonílicos pela HRP está intimamente relacionada à sua constante de equilíbrio enol-ceto ($K_{\text{enol/ceto}}$), sendo essa reação beneficiada pela permanência do composto em maior proporção na forma de enol. A PD quando diluída em água apresenta um valor de $K_{\text{enol/ceto}}$ próximo a 0,23, o qual é superior ao apresentado por outros compostos β -dicarbonílicos como o acetoacetato cuja estrutura molecular é muito semelhante à da PD. Tal característica pode justificar a maior facilidade com que a PD é oxidada pela HRP na ausência de H_2O_2 quando comparada ao acetoacetato (RODRIGUES, 2007).

A oxidação da PD pela HRP (Figura 10) está relacionada à capacidade desse substrato em quelar metais de transição (CZECH; WOJCIECHOWIC, 2006). Dessa forma, o íon férrico presente no grupo heme da HRP é complexado com os grupos carbonila da PD havendo a formação de um radical enolato através da abstração de um hidrogênio (H) ou elétron pelo O_2 presente no meio e a formação do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, uma ERO que pode estar relacionado à citotoxicidade mediada pelo sistema PD/HRP/ O_2 . A enzima, na presença de ânion superóxido, é então convertida à forma de composto-III havendo a produção, também na presença desse radical, de metilglioxal e ácido láctico. Posteriormente, a enzima retorna à sua forma nativa sendo produzidas ERO como o $\text{O}_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 (RODRIGUES et al., 2006).

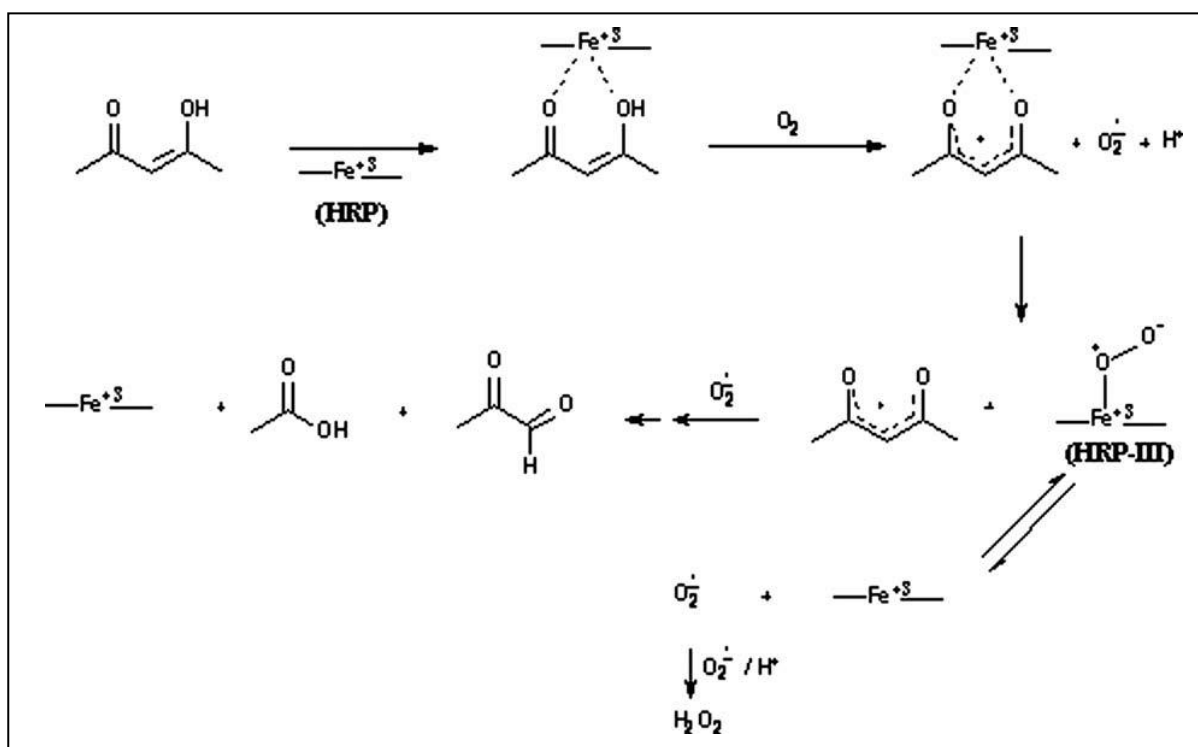


FIGURA 10: Mecanismo de oxidação da PD pela HRP (RODRIGUES et al., 2006).

Assim, a oxidação da PD pela HRP, da mesma forma como evidenciado para o IAA ocorre na ausência de peróxido de hidrogênio, levando a produção de substâncias altamente reativas como o $\text{O}_2^{\cdot -}$ e o metilglioxal, o qual é caracterizado pela capacidade de reagir com sítios nucleofílicos em proteínas e ácidos nucleicos induzindo mutações e morte celular via apoptose ou necrose (KALAIPOS, 1994; THORNALLEY, 1996; Du et al., 2000). A produção dessas substâncias justifica a elevada citotoxicidade apresentada pela combinação PD/HRP em neutrófilos humanos, a qual foi superior à do metilglioxal puro quando avaliado de forma isolada (RODRIGUES et al., 2006).

No entanto, apesar da evidência da produção de espécies tóxicas, a citotoxicidade do sistema PD/HRP/ O_2 foi pouco estudada, não tendo sido testado em linhagens tumorais. O que, juntamente com o fato da PD ser uma molécula sintética e, portanto, de mais fácil obtenção do que o IAA, motivou a realização do presente trabalho, com o intuito de investigar a possibilidade de aplicação da PD na terapia ADEPT como uma alternativa ao IAA.

2.8 Espécies reativas de Oxigênio (ERO) e suas ações deletérias

A descoberta das espécies reativas de oxigênio ocorreu no início do século XX quando essas estruturas foram associadas ao processo de rancificação de gorduras. No entanto, acreditava-se que a alta reatividade dessas moléculas e a irreversibilidade das reações químicas inviabilizavam a sua presença em seres vivos. Esse conceito foi revogado uma vez que as espécies reativas de oxigênio encontram-se associados ao desencadeamento de vários processos patológicos (PERCARIO; FREUZ, 1995).

O termo radical livre, utilizado por muitos autores, faz referência a átomos ou moléculas que apresentam um número ímpar de elétrons em sua última camada, sendo esse não emparelhamento de elétrons responsável pela elevada reatividade das mesmas e reduzido tempo de meia-vida (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999). No entanto, esse termo não é o mais correto a ser usado uma vez que algumas dessas espécies reativas não apresentam o elétron desemparelhado na última camada eletrônica. Por essa razão, alguns artigos mais recentes têm usado o termo ERO para designá-las (SAEED et al., 2005).

As ERO podem ser originadas a partir de reações de óxido-redução nas quais uma molécula recebe ou doa elétrons sofrendo uma redução ou oxidação respectivamente. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). No entanto, essas estruturas também podem ser formadas pela fissão homogênea de uma ligação química, ficando cada um dos átomos envolvidos na ligação com um dos elétrons compartilhados (PERCARIO, FREUZ, 1995).

Dentre as espécies reativas de oxigênio encontradas nos organismos vivos pode-se citar o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil ($\cdot OH$), o oxigênio singlete (1O_2), o radical peroxil (RO_2^{\cdot}), a hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e alcóxil (RO) que se diferenciam quanto ao tempo de meia-vida e reatividade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KOHEN; NYSCA, 2002; RIBEIRO et al., 2005).

As ERO, devido a sua elevada instabilidade podem promover, a oxidação de diversos alvos celulares como proteínas, fosfolípidos de membranas celulares e subcelulares e o DNA, comprometendo o funcionamento normal das células

(PACKER, 1997). Por essa razão é importante impedir o aumento dessas espécies no organismo, o que é feito através de um sistema de defesa antioxidante capaz de atuar através da prevenção da formação de ERO, eliminação de ERO já formadas ou reparando as moléculas modificadas pela ação das ERO (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A ruptura desse estado de equilíbrio entre as condições pró-oxidantes e antioxidantes é designada estresse oxidativo e, é caracterizada por uma elevação nos níveis de ERO e outras espécies radicalares no organismo. Tal situação pode ou não estar associado a uma redução da eficiência do sistema antioxidante e predispõe inúmeras transformações celulares e mutações que podem levar ao desenvolvimento de neoplasias (SIES, 1997; BETTERIDGE, 2000; KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010).

A ação deletéria das ERO sobre proteínas ocorre através da oxidação dos aminoácidos, o que conseqüentemente induz a fragmentação das proteínas e a modificação estrutural das mesmas. Contudo, essas espécies podem também promover uma degradação proteolítica mais intensa levando a perda funcional expressiva (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005).

A atuação dessas espécies sobre os lipídeos é mais estudada e, portanto mais conhecida quando comparada à oxidação de outras macromoléculas. A lipoperoxidação (LPO) provavelmente se constitui no evento citotóxico primário mediado pelas ERO iniciando a sequência de lesões celulares, as quais consistem numa cascata de reações químicas desencadeadas pela ação das ERO sobre os fosfolipídeos das membranas celulares (LIMA; ABDALLA, 2001; REPETTO; SEMPRINE; BOVERIS, 2012).

Considerando que as membranas celulares e organelas apresentam grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados e que essas insaturações interferem na fluidez das membranas, pode-se inferir que qualquer alteração na camada lipídica compromete não somente a fluidez dessas estruturas como também a permeabilidade das mesmas. Isto deve resultar em perda da seletividade na troca iônica e liberação dos conteúdos de organelas, inclusive das enzimas hidrolíticas dos lisossomos, além da formação de produtos citotóxicos, alterações nas sequências de DNA e morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MAFRA, et al., 1999).

As ERO podem agir sobre a fita de DNA através da oxidação das bases pirimídicas, púricas ou das desoxirriboses o que está associado ao desenvolvimento de mutações e, conseqüentemente, à promoção de neoplasias, uma vez que essas sequências modificadas podem atuar como ativadoras de proto-oncogenes ou inativar genes supressores de tumor. Os produtos provenientes da peroxidação lipídica também podem estar associados ao desenvolvimento de câncer (KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010; BARRERA, 2012; REPETTO; SEMPRINE; BOVERIS, 2012).

É primordial conhecer os mecanismos que levam a formação de ERO assim como os que estão relacionados à sua regulação *in vivo* para que se possa exercer controle sobre esses processos modulando-os de forma a obter os efeitos desejáveis dentro de sistemas biológicos (RIBEIRO et al., 2005).

2.9 Ensaios de citotoxicidade: princípios e aplicações na pesquisa de drogas antitumorais

Embora existam diversos fármacos disponíveis para a aplicação na terapia antineoplásica, os problemas apresentados por eles relacionados à baixa seletividade e alta toxicidade estimulam a busca por novas substâncias com atividade antitumoral. Nesse contexto, os bioensaios de citotoxicidade *in vitro* apresentam-se como importantes ferramentas para a triagem pré-clínica da atividade tóxica dessas substâncias em diferentes linhagens celulares (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Os ensaios colorimétricos que permitem quantificar a proliferação de células em cultura são importantes alternativas para a determinação da atividade antitumoral de diversas substâncias por se tratarem de métodos rápidos, de fácil execução e baixo custo. Para este fim, vários corantes estão disponíveis, e são capazes de determinarem a viabilidade celular através de diferentes parâmetros celulares e metodologias. Dentre eles podem ser citados o ensaio da lactato desidrogenase (LDH), do vermelho neutro (VN), fosfatase ácida (PAC), sulforodamina B (SRB), azul de Trypan, iodeto de propídio, cristal violeta e MTT {brometo de[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Dentre esses ensaios, um dos mais utilizados atualmente para a quantificação da proliferação celular e avaliação da citotoxicidade celular é o MTT, um sal tetrazólio, que permite a quantificação do metabolismo mitocondrial e a atividade da cadeia transportadora de elétrons (MOSMANN, 1983; HUSSAIN; NOURI; OLIVER, 1993; SIEUWERTS et al., 1995; BERRIDGE; HERST; TAN, 2005).

O ensaio de viabilidade celular pelo MTT baseia-se na redução do sal MTT, um substrato amarelo escuro solúvel em água que penetra na célula por endocitose, pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase assim como pela NADH e NADPH originando cristais de formazan de cor azul escuro (Figura 11) (HUSSAIN; NOURI; OLIVER, 1993).

Os cristais de formazan se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo posteriormente transportados para fora das células por exocitose, indicando que a redução do MTT depende da atividade redox celular e, portanto, corresponde a um reflexo da função mitocondrial. Assim, alterações na atividade dessa organela resultam em mudanças na quantidade de formazan produzido e, conseqüentemente na absorbância do meio reacional (HUSSAIN; NOURI; OLIVER, 1993; SYLVESTER, 2011).

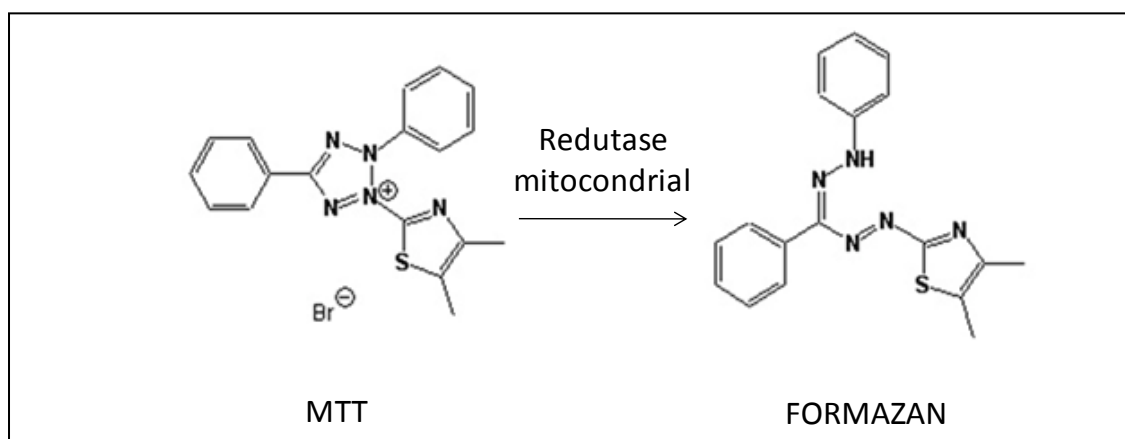


FIGURA 11: Redução do MTT por enzimas mitocondriais

Este processo acontece apenas quando a mitocôndria está viável, ou seja, com o sistema enzimático funcionando corretamente, mantendo a atividade de desidrogenases. O MTT é bio-reduzido pelas células em um produto colorido,

formazan (sal tiazólico), sendo esse dissolvido em DMSO assim como em outros solventes como isopropanol, etanol, dodecil sulfato de sódio e ácido tricloroacético (MOSMANN, 1983; BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988; BERRIDGE; HERST; TAN, 2005; HATOK et al., 2009).

Outra metodologia muito utilizada para a realização dos ensaios de citotoxicidade é o ensaio do vermelho neutro, o qual permite verificar a viabilidade celular através da avaliação da permeabilidade da membrana e da atividade lisossômica da célula. Uma vez que esse corante catiônico fraco, em pH fisiológico, penetra prontamente através da membrana celular, por difusão passiva não-iônica, e se acumula intracelularmente nos lisossomos sendo combinado com a parte aniônica da matriz lisossômica, que apresenta pH inferior ao citoplasmático (MALEK et al., 2011).

Em situações em que há perda desse gradiente de pH entre os lisossomos e o citoplasma, assim como alterações na membrana celular ou na membrana lisossômica, levando à fragilidade dessa organela, há uma diminuição da absorção e assimilação do vermelho neutro fazendo com que as células permaneçam incolores. Assim, é possível distinguir células viáveis de células danificadas ou mortas, o que representa a base do ensaio (BORENFREUN; BABICH; MARIN-ALGUACIL, 1988; MALEK et al., 2009).

O ensaio de viabilidade celular pelo azul de Trypan avalia a integridade da membrana celular. O azul de Trypan é um corante de peso molecular elevado que penetra por poros presentes na membrana de células que se encontram em processo de morte celular, as quais adquirem uma cor azul permitindo distingui-las de células viáveis que permanecem brilhantes. Apesar da subjetividade dessa técnica, uma vez que a porcentagem de viabilidade celular é determinada através da contagem em câmara de Neubauer de células vivas e mortas, ela ainda é muito utilizada por se tratar de uma metodologia de baixo custo e de simples execução (STROBER, 2001; PEREIRA et al., 2010).

Estudos recentes têm investigado a possibilidade de realização do ensaio de viabilidade celular pelo azul de Trypan em citometria de fluxo o que confere maior sensibilidade à leitura, uma vez que elimina a subjetividade inerente à experiência do analista. Além disso, o teste de exclusão do azul de Trypan por citometria de fluxo apresentou uma forte correlação positiva com o ensaio do iodeto de propídeo, também realizado em citômetro de fluxo, e com a contagem, em câmara de

Neubauer, das células marcadas pelo azul de Trypan, o que demonstra a elevada eficiência dessa técnica (AVELAR-FREITAS et al., 2014).

A investigação da viabilidade celular pode ser efetuada através do uso de metodologias bastante distintas, que permitem uma análise baseada em diferentes parâmetros estruturais e funcionais da célula, que se alteram em estágios diferentes do processo de morte celular. Por essa razão, para aumentar a confiabilidade do estudo e delinear a ordem com que as alterações celulares ocorrem é importante escolher de forma adequada a metodologia a ser usada e utilizar mais de um modelo durante o estudo (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a citotoxicidade mediada pela reação de oxidação da 2,4-pentanediona (PD) pela *Horseradish peroxidase* (HRP) e estabelecer uma comparação com a citotoxicidade induzida pela reação de oxidação do ácido indol-3-acético (IAA) catalisada pela mesma enzima.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a formação de ERO durante a oxidação dos substratos PD e IAA pela enzima HRP;
- Delinear os tipos de ERO formadas pelas reações de oxidação dos substratos PD e IAA pela enzima HRP através do uso de substâncias antioxidantes, também denominadas “scavengers” de radicais livres, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e formato de sódio (FS);
- Comparar a formação de ERO mediada pelos sistemas IAA/HRP/O₂ e PD/HRP/O₂;
- Avaliar a citotoxicidade inerente à oxidação da PD pela HRP através dos ensaios de exclusão pelo azul de Trypan (AT), MTT e vermelho neutro (VN) utilizando diferentes tipos celulares, dentre eles: leucócitos humanos, fibroblastos L929 e células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231;
- Avaliar a citotoxicidade inerente à oxidação do IAA pela HRP através dos ensaios de exclusão pelo AT, MTT e VN utilizando diferentes tipos celulares, dentre eles: leucócitos humanos, fibroblastos L929 e células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231;
- Comparar a citotoxicidade mediada pelos sistemas IAA/HRP/O₂ e PD/HRP/O₂;

- Comparar as metodologias usadas para a avaliação da viabilidade celular dos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂: azul de trypan (AT), MTT e vermelho neutro (VN);
- Avaliar a ocorrência de morte celular por apoptose mediada pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

Ácido Indol-3-acético (IAA) (SIGMA-ALDRICH), acetilacetona (PD) (VETEC), Horseradish peroxidase (SIGMA-ALDRICH), 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (SIGMA-ALDRICH), álcool etílico 96°GL (ISO FAR), brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (SIGMA-ALDRICH), Azul de Trypan (SIGMA-ALDRICH), vermelho neutro (PROQUÍMIOS), dimetilsulfóxido (SIGMA-ALDRICH), ácido acético glacial (VETEC) Kit apoptose Annexina V-FICT- Iodeto de propídeo (BD Pharmingen); solução de hidróxido de sódio 0,01 N (VETEC), meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640- SIGMA-ALDRICH), meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM-SIGMA-ALDRICH), L-glutamina (SIGMA-ALDRICH), suspensão de antibióticos penicilina (10.000 U/mL)/estreptomicina (10 mg/mL) (SIGMA-ALDRICH), soro fetal bovino (GIBCO), cloreto de sódio (NaCl) (PROQUÍMIOS), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (VETEC), cloreto de potássio (KCl) (Casa da Química-CAQ), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) (VETEC), bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (VETEC), cloreto de cádmio (CdCl_2) (PROQUÍMIOS), corante Giemsa (NEWPROV), corante May-Grunwald (DOLES), superóxido-dismutase (SOD) (SIGMA-ALDRICH), catalase (SIGMA-ALDRICH), formato de sódio (SIGMA-ALDRICH), Ficoll- Hystopaque (SIGMA-ALDRICH), líquido de Türk (RENYLAB), Doxolem[®] (Cloridrato de doxorubicina, 50 mg- ZODIAC),

4.2 Preparo das Soluções-estoque e meios de cultura

4.2.1 Tampão fosfato-salino (PBS)

O preparo de 1 L da solução estoque de tampão fosfato-salino PBS (*phosphate buffered saline*) 1X foi realizado através da dissolução de 8,0 g de cloreto de sódio (NaCl), 1,155 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e 0,24 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) em aproximadamente 800 mL de água ultrapurificada. Após a completa dissolução o pH da solução foi ajustado para aproximadamente 7,4. Após essa etapa, o volume da solução foi completado para 1L adicionando-se água ultrapurificada. A solução foi então esterilizada mediante exposição ao vapor úmido em autoclave (PHOENIX-LUFERCO) a 121°C durante 15 minutos e posteriormente armazenada em geladeira em temperatura entre 2°C e 8°C.

4.2.2 Tampão fosfato de sódio 25 mM

O tampão fosfato de sódio 25 mM foi preparado através da mistura das seguintes soluções:

Solução A: Fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4) 25 mM

Para a preparação dessa solução dissolveu-se 1,5 g de NaH_2PO_4 em 500 mL de água ultrapurificada.

Solução B: Fosfato de sódio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 25 mM

Para a preparação dessa solução dissolveu-se 3,35 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 500 mL de água ultrapurificada.

Mediu-se o pH da solução B e adicionou-se a ela a solução A até que o pH da solução final se estabilizasse em torno de 7,2. O volume final da solução foi

ajustado para 500 mL utilizando água ultrapurificada. A solução tampão foi então armazenada em geladeira em temperatura entre 2°C e 8°C (KIM et al., 2006).

4.2.3 Solução de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH) ativada

A 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) para que possa ser oxidada por ERO deve ser inicialmente ativada mediante desacetilação. A ativação da DCFH-DA foi realizada através da adição de 350 µL da solução estoque de DCFH-DA 1 mM em etanol a 1,75 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,01 N. Essa mistura foi mantida em repouso durante 20 minutos e posteriormente foram adicionados a ela 17,9 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,2. (KIM et al., 2006).

4.2.4 Solução de Superóxido dismutase (SOD)

A solução de superóxido dismutase (SOD) 10000 U/mL foi preparada através da solubilização de 6,73 mg da SOD (1 mg=2970 U) em 2 mL de água ultrapurificada. A partir dessa solução, por diluição em água ultrapurificada, foram preparadas as demais soluções da SOD nas concentrações de 5000 e 1000 U/mL.

4.2.5 Solução de catalase (CAT)

A solução de catalase 10000 U/mL foi preparada através da solubilização de 8,57 mg da CAT (1 mg=3500 U) em 2 mL de água ultrapurificada. A partir dessa solução, por diluição, foram preparadas as demais soluções da CAT nas concentrações de 5000 e 1000 U/mL.

4.2.6 Solução de formato de sódio (FS)

O preparo da solução de formato de sódio (FS) 1000 mM foi realizada através da solubilização de 0,1362 g do FS em 2 mL de água ultrapurificada ($P.M_{\text{formato de sódio}} = 68,01 \text{ g/mol}$). A partir dessa solução, por meio de diluição em água ultrapurificada, foram preparadas as outras soluções de FS a 500 e 100 mM.

4.2.7 Solução de Cloreto de Cádmio (CdCl_2) 20 mM

A solução estoque de cloreto de cádmio (CdCl_2) foi preparada na concentração de 20 mM através da solubilização em água ultrapurificada. Após filtração em filtro de membrana para seringa com poros de $0,22 \mu\text{m}$ de diâmetro (TPP) a solução foi armazenada em frasco âmbar a temperatura ambiente (ROMERO et al., 2003).

4.2.8 Solução de doxorubicina (DXR) 1,5 mg/mL

A solução de DXR na concentração de 1,5 mg/mL foi preparada imediatamente antes do uso ou no máximo 24 horas antes do experimento. Pesou-se em balança analítica (SHIMADZU) aproximadamente 0,0165 g da formulação Doxorubicina (DOXOLEM[®]), uma vez que cada frasco apresenta 50 mg de doxorubicina em 550 mg da formulação, e solubilizou-se em tampão PBS 1X pH 7,4. A solução foi armazenada em temperatura ambiente até o momento do uso.

4.2.9 Solução de trabalho do corante Giemsa

A solução do corante Giemsa para uso na coloração de células seguindo o método de May Grunwald- Giemsa, foi preparada através da adição de uma gota do corante Giemsa para cada mL de água ultrapurificada. A solução foi preparada de preferência imediatamente antes do uso, podendo, no entanto vir a ser guardada por no máximo 24 horas.

4.2.10 Solução estoque de Azul de Trypan 0,4 %

Para o preparo da solução estoque de Azul de Trypan 0,4 % pesou-se 0,04 g do corante Azul de Trypan e dissolveu-se em 10 mL de uma solução tampão PBS 1X pH 7,4 estéril. Após filtração em filtro de membrana para seringa com poros de 0,22 µm de diâmetro a solução foi conservada em frasco âmbar a temperatura ambiente.

4.2.11 Solução de MTT 5 g/L

A solução estoque de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) 5 g/L foi preparada através da dissolução de 5 mg de MTT em 1 mL de tampão PBS 1X pH 7,4 estéril. A solução foi armazenada geladeira em temperatura entre 2°C e 8°C, em frasco âmbar recoberto por papel alumínio.

4.2.12 Solução de Vermelho Neutro 4 g/L

A solução de vermelho neutro foi preparada pela solubilização de 4 mg de Vermelho Neutro em 1 mL de tampão PBS 1X pH 7,4 estéril. Após o preparo, a

solução foi armazenada em temperatura ambiente em frasco âmbar recoberto por papel alumínio.

4.2.13 Solução de trabalho de Vermelho Neutro 40 µg/mL

A solução de trabalho de vermelho neutro 40 µg/mL foi preparada em capela de fluxo laminar pela adição de 0,1 mL da solução estoque de vermelho neutro, cuja preparação foi descrita no tópico anterior, a 9,9 mL de meio de cultura devidamente suplementado com 10% de Soro fetal bovino, 1,6 % de L-glutamina e 1% da suspensão estabilizada de antibióticos: Penicilina (10.000 U/mL)/Estreptomicina (10 mg/mL). Em seguida, a solução foi incubada a 37 °C durante 24 horas em estufa a 5 % de CO₂ (LABOVEN) para que ocorresse a solubilização dos cristais de vermelho neutro, e posteriormente foi centrifugada (centrífuga- THERMO SCIENTIFIC) por 10 minutos a 600 x g (1800 rpm) para remover os precipitados do corante (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

4.2.14 Solução extratora de álcool-ácido (1% de ácido acético em 50% de álcool etílico absoluto)

A solução extratora do corante vermelho neutro foi preparada, imediatamente ou no máximo uma hora antes do uso, pela mistura de 50 mL de etanol e 1 mL de ácido acético glacial em quantidade de água ultrapurificada suficiente para completar 100 mL de solução (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

4.2.15 Solução estoque HRP

A solução estoque da HRP foi preparada em água ultrapurificada e sua concentração foi determinada através da determinação da absorbância dessa

solução em espectrofotômetro (DYNAMICA: HALO DB-20 Spectrophotometer) no comprimento de onda (λ) de 403 nm e do seu coeficiente de extinção molar (ϵ), também designado coeficiente de absorvidade molar, que corresponde à capacidade que um mol de substância apresenta de absorver a luz nesse mesmo λ . Para o cálculo da concentração da enzima HRP em solução foi utilizada a Equação 3 (Lei de Lambert-beer):

$$\text{Abs} = \epsilon \times C \times L \text{ (Equação 3)}$$

Onde: Abs corresponde à abosorbância da solução de HRP; ϵ corresponde ao coeficiente de extinção molar da HRP em 403 nm ($\epsilon_{403 \text{ nm}} = 1,02 \times 10^5 \text{ (mol/L)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; C corresponde a concentração (mol/L) da HRP na solução e L corresponde ao caminho óptico (cm), geralmente 1 cm (OHLSSON; PAUL, 1976).

4.2.16 Meio de cultura DMEM

O meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) em pó, sem bicarbonato de sódio, com alta concentração de glicose (4500 mg/L) e com L-glutamina foi dissolvido em aproximadamente 900 mL de água ultrapurificada. Posteriormente foi adicionado 3,7 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e o pH da solução foi ajustado para 7,2. Após completar o volume da solução para 1L utilizando água ultrapurificada, essa foi esterilizada por filtração a vácuo, em capela de fluxo laminar, através do uso de um filtro de membrana com poros de 0,22 μm de diâmetro (MILLIPORE) de acordo com as especificações do fabricante. O meio DMEM foi então armazenado em geladeira em temperatura entre 2° e 8°C, acondicionado em frascos previamente esterilizados.

O meio foi suplementado antes do uso através da adição de 10% de Soro fetal bovino e 1% de uma solução estabilizada de penicilina (10.000 U/mL)/estreptomicina (10 mg/mL). O processo de suplementação foi realizado em capela de fluxo laminar.

4.2.17 Meio de cultura RPMI

O meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) utilizado nos experimentos foi o meio RPMI-1640 em pó, sem L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (NaHCO_3). Pesou-se 16,4 g do meio RPMI e dissolveu-se em 900 mL de água ultrapurificada. Adicionou-se 2,0 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), e acertou-se o pH para aproximadamente 7,2. O volume do meio de cultura foi completado para 1000 mL pela adição de água ultrapurificada. Em uma capela de fluxo laminar o meio de cultura foi esterilizado por filtração a vácuo utilizando um filtro de membrana com poros de 0,22 μm de diâmetro e posteriormente armazenado em frascos estéreis em geladeira em temperatura entre 2°C e 8°C.

A suplementação do meio RPMI foi realizada de forma semelhante a já descrita para o meio DMEM com exceção de que ao meio de cultura RPMI foi necessária a adição de 1,6 % de L-glutamina 200 mM além dos demais reagentes como o soro fetal bovino (10%) e a solução estabilizada de penicilina (10.000 U/mL)/estreptomicina (10 mg/mL) (1%).

4.3 Avaliação da produção de ERO pelos sistemas PD/HRP/ O_2 e IAA/HRP/ O_2

4.3.1 Princípio do método

A 2,7-diclorofluoresceína (DCFH) é um composto estável e não-fluorescente que quando oxidada por ERO gera um produto fluorescente, a 2,7-diclorofluoresceína (DCF), cuja produção é diretamente proporcional a quantidade de ERO no meio (WANG; JOSEPH, 1999). Dessa forma, o uso desse marcador oxidativo no estudo da oxidação dos substratos IAA e PD pela HRP permite, através da determinação da absorbância do meio reacional, inferir sobre a produção de ERO nessas reações (KIM et al., 2006).

4.3.2 Preparo do meio reacional

A reação foi realizada em placas de ELISA de 96 poços de fundo chato (GLOBAL TRADE TECHNOLOGY). A mistura de reação apresentou um volume final de 180 μL , sendo 150 μL de DCFH ativada na concentração final de 0,0146 mM, 20 μL dos substratos IAA ou PD nas concentrações de 9×10^{-3} M ou $2,7 \times 10^{-2}$ para obter as concentrações finais de 1 mM e ou 3 mM respectivamente; e 10 μL da HRP na concentração de 36×10^{-6} M para uma concentração final da HRP em cada poço de 2×10^{-6} M. Para critério de comparação foram preparados meios reacionais contendo apenas a DCFH isolada ou os substratos, IAA ou PD, juntamente com a DCFH e água ultrapurificada mas na ausência da HRP.

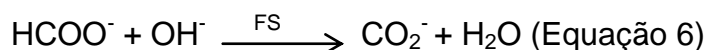
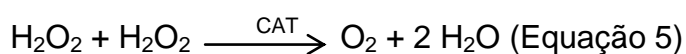
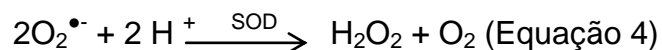
As reações foram realizadas em triplicata e a absorbância medida em um leitor de ELISA (HUMAREADER SINGLE) em um comprimento de onda de 492 nm em intervalos de 10 minutos durante uma hora conforme a metodologia realizada por KIM et al. (2006).

4.3.3 Ação de “scavengers” na formação de ERO pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂

4.3.3.1 Princípio do método

Sabe-se que na reação de oxidação dos substratos IAA e PD pela enzima HRP espécies reativas de oxigênio são formadas (KIM; JEON; PARK, 2004; KIM et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006). Dessa forma, para delinear algumas dessas ERO foram utilizadas substâncias designadas “scavengers”, as quais são varredoras capazes de neutralizar espécies reativas formadas. Assim, buscou-se avaliar o comportamento da absorbância dos meios reacionais contendo o sistema enzima-substrato completo, quando a esses eram adicionadas substâncias varredoras como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e o formato de sódio (FS) (KIM et al.,

2006). A SOD promove a conversão do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 (Equação 4) (ANDRADE JUNIOR et al., 2005). A CAT realiza a conversão do H_2O_2 em oxigênio e água como mostrado na Equação 5 (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). O FS é um sal de ácido fórmico de fórmula estrutural $HCOONa$, que atua como um capturador de hidroxilas. O íon formato reage com radicais OH^{\bullet} levando a formação do radical formil como é mostrado na Equação 6 (LOWN; CHEN, 1981):



4.3.3.2 Preparo do meio reacional

Para o delineamento do(s) tipo(s) de ERO formada(s) nessas reações de oxidação os três varredores, SOD, CAT e FS foram avaliados separadamente em uma mistura reacional de 200 μ L. Os varredores SOD e CAT foram testados nas concentrações finais de 100, 500 e 1000 U/mL e adicionados aos meios reacionais contendo a enzima HRP e o substrato, IAA ou PD. Para a avaliação do efeito do FS na produção de ERO pelos sistemas PD/HRP/ O_2 e IAA/HRP/ O_2 , utilizou-se esse varredor nas concentrações finais de 10, 50 e 100 mM. Como controles foram utilizados meios reacionais contendo os sistemas enzima-substrato na ausência dos varredores, além dos demais controles representados pelos meios reacionais contendo apenas a DCFH isolada ou os substratos, IAA ou PD, juntamente com a DCFH e na ausência da HRP.

As reações foram preparadas em placas de ELISA de 96 poços de fundo chato e realizadas em triplicata. A absorbância foi medida em um leitor de ELISA no comprimento de onda de 492 nm, em intervalos de 10 minutos durante uma hora conforme a metodologia já descrita anteriormente (KIM et al., 2006).

4.4 Avaliação da citotoxicidade dos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂

4.4.1 Células

Foram utilizados nos experimentos leucócitos totais provenientes do sangue periférico de doadores voluntários saudáveis, fibroblastos L929 e uma linhagem tumoral MDA-MB-231. A linhagem celular L929 foi adquirida a partir do laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), e consiste em um subclone da linhagem parental L que foi estabelecida por W. R. Earle em 1940, sendo derivada do tecido subcutâneo da auréola de camundongos machos C3H/Na (BAXTER et al., 2002). Foi uma das primeiras linhagens celulares a ser estabelecida em cultura contínua e é citada como referência para ensaios de citotoxicidade (SERRANO et al., 2004).

A linhagem MDA-MB-231 foi gentilmente cedida pelo laboratório de Cultura celular pertencente ao Departamento de Produtos Farmacêuticos da UFMG e consiste em células de câncer de mama obtidas pela primeira vez a partir da efusão pleural de uma paciente em 1973 no M. D. Anderson Cancer Center (CAILLEAU et al., 1974; CAILLEAU; OLIVÉ; CRUCIGER, 1978; BRINKLEY et al., 1980).

A escolha da linhagem tumoral MDA-MB-231 se baseou no fato dela representar um modelo de fácil manutenção em laboratório (BURDALL et al., 2003) e devido ao seu caráter de resistência à quimioterapia convencional, o que é uma característica comum das linhagens triplo-negativas dentre elas a MDA-MB-231. Esse termo é usado para designar os tumores de mama que não apresentam receptores de estrogênio, de progesterona e do fator de crescimento epidérmico (HER-2/neu) sendo, portanto, dificilmente controlados por imunoterapia e também refratários aos agentes citotóxicos comumente usados como o 5-Fluorouracila, o que ocorre após uma série de ciclos de administração e através de mecanismos complexos e não totalmente elucidados (CHAVEZ; GARIMELLA; LIPKOWITZ, 2010; LIU et al., 2011). Essa resistência à quimioterapia associada ao caráter agressivo e metastático dessas linhagens justifica a mortalidade induzida por elas que representam 15% do total de tumores de mama (LIU et al., 2011).

4.4.2 Obtenção de células sanguíneas

4.4.2.1 Voluntários

Os voluntários que concordaram em participar da pesquisa mediante convite pessoal preencheram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Institucional da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) sob o número 031/2009. Antes da coleta eram questionados quanto ao estado de saúde atual e se estavam fazendo uso de algum medicamento.

4.4.2.2 Coleta de sangue

As amostras de sangue venoso periférico em um volume de 10 mL por experimento foram coletadas por punção da veia antecubital mediana, na fossa antecubital, com sistema à vácuo com agulhas descartáveis (LABORIMPORT) e armazenadas em tubos esterilizados (LABORIMPORT) e também descartáveis contendo heparina, como anticoagulante. Antes da realização do procedimento, foram separados todos os materiais necessários para a coleta como os tubos, garrote (BIOSAN), luvas (SUPERMAX), algodão (APOLO), álcool 70% e agulha, sendo que essa foi descartada em recipiente próprio para materiais perfuro-cortantes (DESCARPACK). Os procedimentos de coleta foram realizados por pessoal treinado e capacitado para tal procedimento.

4.4.2.3 Obtenção de células sanguíneas a partir do sangue total periférico

As células mononucleares e polimorfonucleares presentes no sangue venoso coletado de voluntários saudáveis foram separadas por duplo gradiente de densidade através do uso dos reagentes Histopaque® de densidade de 1077 (1,117 g/mL) e 1119 (1,119 g/mL) os quais quando usados juntos permitem rápida separação de células mononucleares e polimorfonucleares a partir de um pequeno volume de sangue total. O procedimento foi realizado seguindo as especificações preconizadas pelo fornecedor, com algumas modificações. Inicialmente, foram adicionados 3 mL de Histopaque 1119 à tubos para centrífuga tipo Falcon de 15 mL (GLOBAL TRADE) estéreis e sobre ele 3 mL de Histopaque 1077. Cuidadosamente foram adicionados 6 mL do sangue coletado sobre a camada de Histopaque 1077. Após centrifugação (Haerus Megafuge 16, THERMO SCIENTIFIC) a 700 x g por 30 minutos, à temperatura ambiente, observou-se completa separação das bandas celulares: os eritrócitos se sedimentam rapidamente ficando na parte inferior do tubo, as células polimorfonucleares formam uma camada opaca na interface entre o histopaque 1077 e 1119, as mononucleares localizam-se na interface superior entre o plasma e o histopaque 1077, as plaquetas encontram-se na interface superior e são eliminadas durante as lavagens (Figura 12).

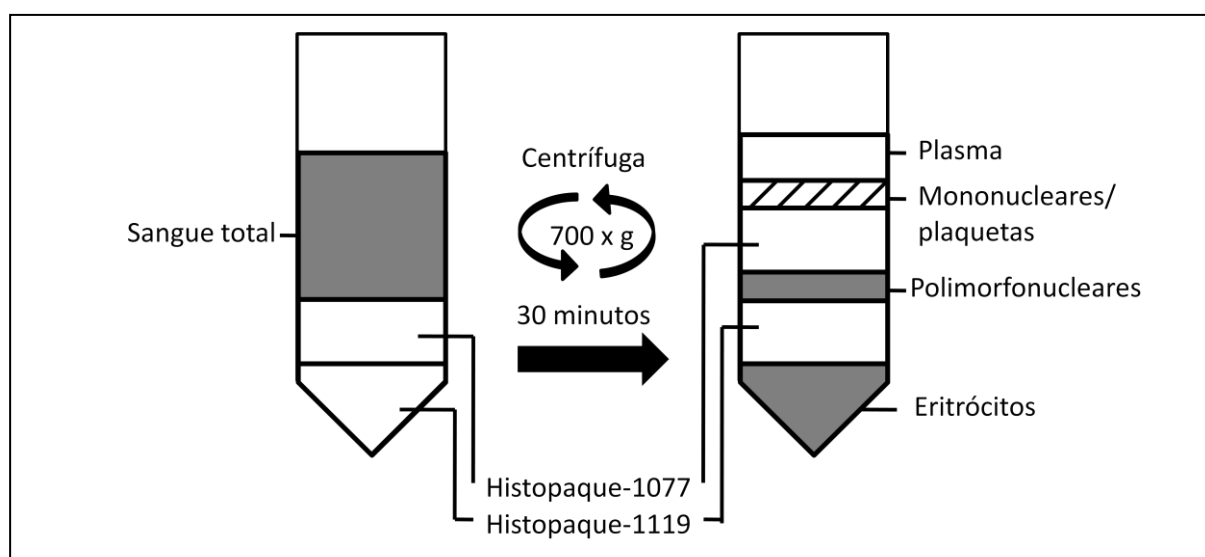


FIGURA 12: Separação de células sanguíneas por gradiente de densidade usando o reagente Ficoll-Hystopaque (Adaptado a partir de SIGMA; ALDRICH-).

A camada de plasma superior foi retirada e descartada e o anel de células mononucleares foi coletado. Descartou-se também a camada de Histopaque 1077 acima do anel de polimorfonucleares sendo essas células também coletadas. As células polimorfonucleares e monocucleares foram lavadas em 10 mL de tampão PBS 1X pH 7,4 mediante centrifugação a 200 x g por 10 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas novamente com o tampão PBS 1X pH 7,4 estéril e centrifugadas a 200 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem foi novamente realizado do modo como descrito anteriormente. As células foram ressuspensas em cerca de 2,0 mL de tampão PBS 1X pH 7,4 (ENGLISH; ANDERSEN, 1974).

4.4.2.4 Contagem em câmara de Neubauer

Para a contagem das células sanguíneas em suspensão obtidas na separação celular, um volume de 20 µL de suspensão de células foi diluído em 380 µL de líquido de Türk em um tubo de ensaio. Este corante cora levemente os leucócitos pelo violeta de genciana, fornecendo uma estimativa da quantidade de células presentes na amostra, além de provocar lise das hemácias devido à presença de ácido acético (1%). A contagem global de leucócitos foi feita em câmara de *Neubauer*. (L-OPTIK). A concentração de células na suspensão (número de células por mL) foi calculada através da Equação 7:

$$\text{Concentração celular} = n^{\circ}\text{células/mL} = \frac{n}{(64/160 \times 1/20) \times 10^3} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde: n é o número de células contadas nos quatro quadrantes; 64/160 corresponde ao volume da câmara da câmara de Neubauer referente aos quatro quadrantes em que as células foram contadas; 1/20 representa a diluição em Líquido de Türk; e 10³ é o fator de correção do volume para mL (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008).

4.4.3 Linhagens celulares L929 e MDA-MB-231

A linhagem celular L929 (Figura 13) que representa uma linhagem permanente foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 1,6 % de L-Glutamina 200 mM, como fonte de energia e 1% de uma solução estabilizada de penicilina (10.000 U/mL)/estreptomicina (10 mg/mL) (MIRANDA, 2007; OZDEMIR; YILMAZ; YILMAZ, 2008).

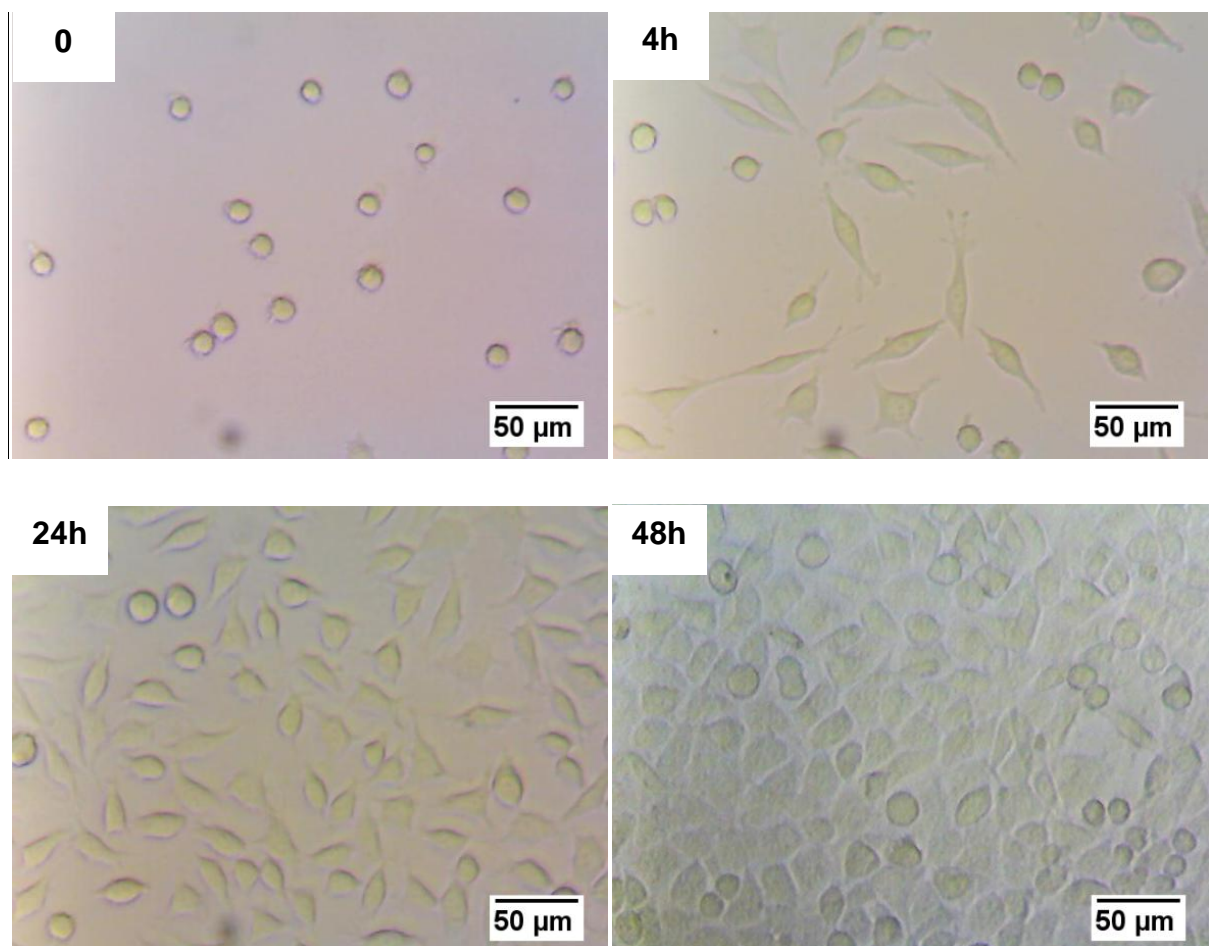


FIGURA 13: Monocamada de células L929 imediatamente, 4 h, 24 h e 48 h após a tripsinização e repique celular (aumento de 100X). Fotos tiradas usando uma câmera para microscópio ocular digital. Imagens fornecidas a partir de um microscópio invertido (Medilux) e processadas usando o software ImageJ.

A linhagem MDA-MB-231 (Figura 14) é uma linhagem tumoral e, também foi cultivada em meio DMEM contendo elevada concentração de glicose (4500 mg/L) e

3 mM (1,6 %) de L-glutamina devidamente suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1% da solução estabilizada de penicilina (10.000 U/ml)/estreptomicina (10 mg/mL) segundo as especificações da *American Type Culture Collection- ATCC* (2012).

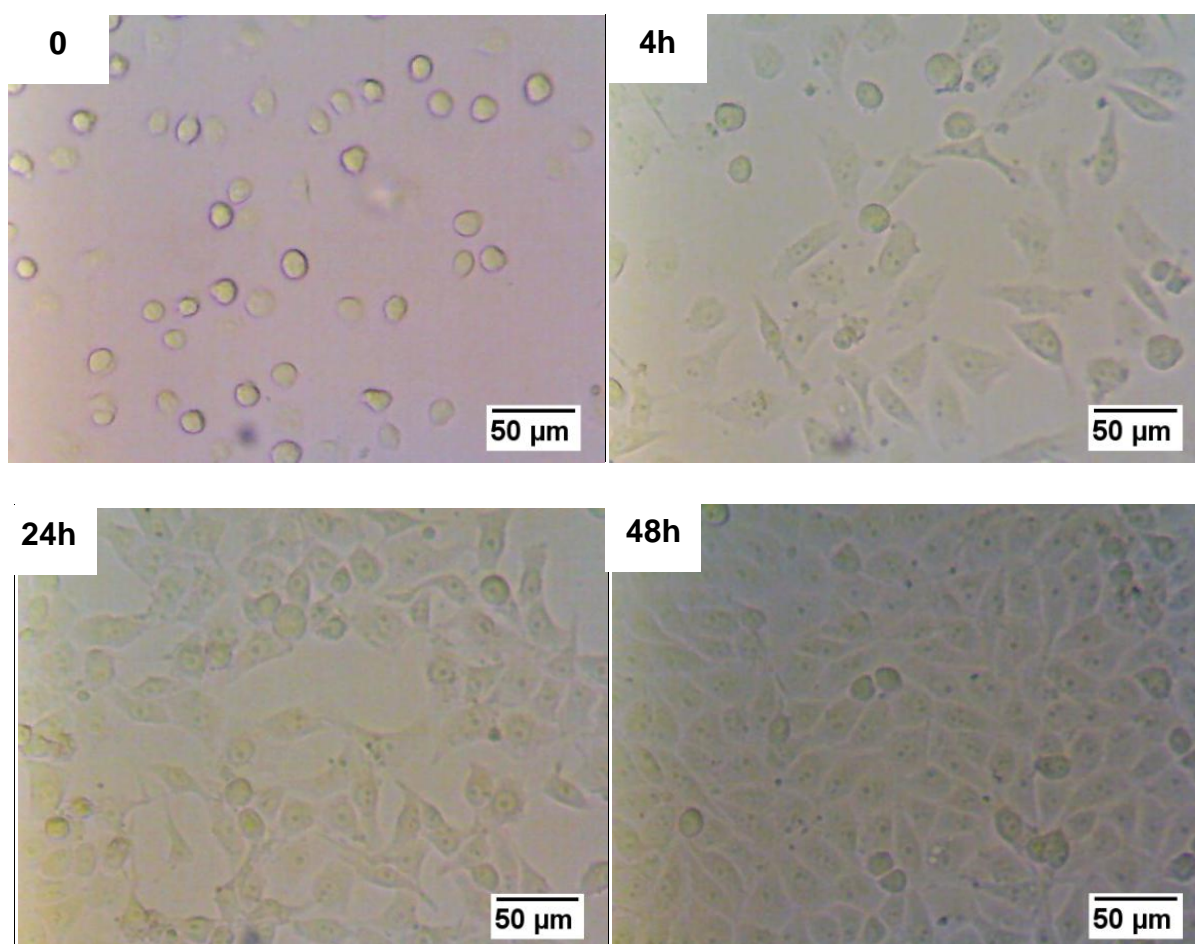


FIGURA 14: Monocamada de células MDA-MB-231 imediatamente, 4 h, 24 h e 48 h após a tripsinização e repique celular (aumento de 100X). Fotos tiradas usando uma câmera para microscópio ocular digital. Imagens fornecidas a partir de um microscópio invertido (Medilux) e processadas usando o software ImageJ.

O subcultivo, que consiste na passagem de células a partir de uma cultura confluenta para outras garrafas foi realizado em intervalos de tempo regulares a fim de mantê-las em crescimento exponencial. Assim, esse procedimento foi realizado em intervalos de 3 a 4 dias para a linhagem L929 e de 2 a 3 dias para a linhagem tumoral MDA-MB-231 conforme a confluência celular, que corresponde à ocupação total da área disponível para crescimento celular fazendo com que as células

mantenham contato entre si e com a superfície da garrafa. O processo de subcultivo segundo a *American Type Culture Collection- ATCC* (2014) deve ser realizado quando a confluência da cultura apresentar-se entre 70 e 90%.

Como essas linhagens crescem na forma de monocamadas aderidas, para a realização do subcultivo é necessário destacá-las da garrafa de cultura e romper as ligações intercelulares. O protocolo utilizado para o subcultivo celular foi adaptado a partir da *American Type Culture Collection- ATCC* (2010). Para tanto, o meio de cultura da garrafa, de 75 cm² ou de 175 cm² de área, foi removido e substituído por 5 mL ou 10 mL, respectivamente, de tampão PBS 1X, pH 7,4, estéril. Quanto a dissociação celular, essa foi realizada por tripsinização, adicionando às garrafas 0,5 mL ou 1 mL (garrafa de 75 ou 175 cm² respectivamente) de uma solução 0,5% tripsina- EDTA (10X) diluída em tampão PBS 1X, pH 7,4, estéril (1:10), durante 1 a 5 minutos em estufa de CO₂ a 37°C.

Após as células terem se destacado foram adicionados às garrafas 5 ou 10 mL (garrafa de 75 ou 175 cm² respectivamente) de meio de cultura RPMI ou DMEM suplementado com 10% de SFB e demais suplementos para promover a inativação da tripsina. Esse volume foi redistribuído entre novas garrafas de cultura.

As culturas apresentavam 70-90% de confluência antes da realização dos experimentos, sendo cuidadosamente avaliadas quanto à presença de alterações macroscópicas e microscópicas através do uso de um microscópio invertido antes dos ensaios, uma vez que a presença de alterações morfológicas assim como contaminação microbiana inviabilizaria o uso das mesmas (MIRANDA, 2007).

O processo de tripsinização foi realizado antes de cada experimento para a remoção das células aderidas e obtenção da suspensão celular a ser transferida para as placas de cultura. Nesse caso, a concentração das células na suspensão e a viabilidade celular foram determinadas antes dos ensaios através da contagem em câmara de Neubauer mediante diluição em azul de Trypan (1:1), conforme descrito no boletim da ATCC (2010) e mostrado na Equação 8.

$$\text{Concentração celular} = n^{\circ}\text{células/mL} = \frac{n}{(64/160 \times 1/2) \times 10^3} \text{ (Equação 8)}$$

Onde: n é o número de células contadas nos quatro quadrantes; 64/160 corresponde ao volume da câmara da câmara de Neubauer referente aos quatro

quadrantes em que as células foram contadas; 1/2 representa a diluição em azul de Trypan; e 10^3 é o fator de correção do volume para mL.

4.4.4 Avaliação da citotoxicidade do sistema PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂ pelo Azul de Trypan

Esse ensaio foi realizado com os leucócitos totais obtidos a partir do sangue periférico de doadores voluntários como descrito no item 4.4.2.3. Semeou-se 1×10^6 células/poço em placas de cultivo celular de 96 poços de fundo chato, que foram cultivadas na presença de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (estreptomicina (10.000U/mL)/penicilina(10 mg/mL)) e 1,6% de L-glutamina. Para critérios de comparação, as células foram incubadas somente na presença do meio de cultivo, o que constituiu o controle negativo de morte celular; e na presença de cloreto de cádmio (CdCl₂) utilizado nos ensaios como controle positivo de morte celular (ROMERO et al., 2003; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Os substratos PD e IAA foram testados na concentração de 1; 1,5; 2; 2,5; 3 e 4 mM na presença e na ausência da enzima HRP na concentração de $2,0 \times 10^{-6}$ M. Além disso buscou-se avaliar o comportamento das células na presença somente da enzima HRP nessa mesma concentração. Foi utilizado um volume final de 200µL por poço. Os ensaios foram realizados em triplicata e após o preparo dos meios reacionais a placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas.

Após as 24 horas de incubação, foram adicionados 50 µL do meio reacional de cada poço da placa a 50 µL de uma solução de Azul de Trypan 0,4% em um tubo de ensaio e, dentro de no máximo 5 minutos, efetuou-se a contagem das células vivas (brilhantes) e mortas (azuis) em Câmara de *Neubauer* espelhada (LABOR OPTIC) em um microscópio óptico (OLYMPUS) e calculou-se a porcentagem de viabilidade celular como mostrado na Equação 9 (XU et al., 2005; PEREIRA et al., 2010):

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ células viáveis}}{\text{n}^{\circ} \text{ células totais}} \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

4.4.5 Avaliação da citotoxicidade do sistema PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂ pelo MTT

O ensaio para a determinação da viabilidade celular pelo MTT foi realizado utilizando leucócitos originados do sangue periférico de doadores voluntários, assim como as linhagens celulares L929 e MDA-MB-231. No ensaio em leucócitos foi utilizada uma concentração de 1×10^6 células/mL em um volume final de 200 µL/poço. As alíquotas da suspensão celular foram transferidas para cada poço da placa de cultivo celular de 96 poços de fundo chato contendo o meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico e 1,6% de L-glutamina.

Os meios reacionais foram preparados da mesma forma como descrito para a metodologia do azul de Trypan (Sessão 4.4.4). A placa foi incubada a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 24 horas. Após esse período, a placa foi centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante contido em cada poço foi retirado e substituído por 200 µL de uma solução de meio de cultura RPMI contendo MTT em uma concentração final de 0,5 mg/mL. A placa foi novamente incubada a 37°C, sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ onde permaneceu por 4 horas, conforme padronizado para o presente ensaio (MOSMANN, 1983; SIEUWERTS et al., 1995).

Após esse período centrifugou-se a placa novamente a 2500 rpm por 15 minutos; o meio de cultura com MTT foi removido de todos os poços e adicionou-se a eles 200 µL de DMSO para a diluição dos cristais de formazan. A placa foi mantida em agitação no agitador de placas (KLINE) durante 15 minutos e após esse tempo, a absorbância foi determinada em leitor de ELISA (MOLECULAR DEVICES) no comprimento de onda de 540 nm (SIEUWERTS et al., 1995).

Os resultados obtidos foram utilizados para a determinação da porcentagem de viabilidade celular para cada meio reacional, a qual foi calculada por comparação entre a absorbância determinada para cada meio reacional e a absorbância do controle negativo de morte celular que corresponde a 100% da viabilidade celular (Equação 10):

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{ABS teste}}{\text{ABS controle negativo}} \times 100 \quad (\text{Equação 10})$$

Onde: ABS teste corresponde à média dos três valores (triplicata) de absorbância determinados para aquele meio reacional (teste) e ABS controle negativo corresponde à média dos três valores (triplicata) de absorbância determinados para o controle negativo de morte celular. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (HUSSAIN; NOURI; OLIVER, 1993).

No experimento em células L929 e MDA-MB-231 utilizou-se uma concentração de células/poço de 1×10^5 células/mL, que foram transferidas para as placas de 96 poços contendo o meio de cultura DMEM suplementado. As células foram então incubadas durante 24 horas em estufa a 37°C e 5 % de CO₂, na presença somente do meio de cultura, para promover formação de uma monocamada celular mediante a adesão dessas células à superfície dos poços.

Após esse período, o meio de cultura foi cuidadosamente removido de todos os poços e substituído por meio de cultura, previamente suplementado contendo as substâncias cuja atividade citotóxica se queria avaliar. Os meios reacionais, para o ensaio em fibroblastos L929, foram preparados de modo semelhante ao exemplificado para o ensaio do azul de Trypan em leucócitos (Sessão 4.4.4), enquanto que no ensaio em MDA-MB-231 foi utilizado um segundo controle positivo de morte celular, a doxorrubicina (DXR), um antitumoral amplamente empregado (KEIZER et al., 1990), que nesses experimentos foi usada na concentração de 15 µg/mL (GIOCONDO, 2007; DUARTE, 2010).

A placa foi também incubada a 37 °C e 5% CO₂ durante 24 horas, sendo após esse período o meio de cultura removido, sem ser necessária a etapa de centrifugação, uma vez que as linhagens L929 e MDA-MB-231 aderem aos poços da placa de cultura. Foi adicionado a todos os poços da placa o meio de cultura DMEM contendo MTT, na mesma proporção mencionada anteriormente, e a partir de então os procedimentos realizados para a metodologia de avaliação da viabilidade celular pelo MTT em células L929 e MDA-MB-231 foram iguais aos já descritos para os leucócitos.

4.4.6 Avaliação da citotoxicidade dos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂ pelo vermelho neutro (VN)

O ensaio de viabilidade celular segundo a metodologia do vermelho neutro foi realizado em leucócitos humanos, células L929 e células MDA-MB-231. No experimento utilizando leucócitos foi empregada uma concentração de células por poço de 1×10^6 células/mL, as quais foram incubadas em placas de cultivo celular de 96 poços de fundo chato na presença de meio RPMI suplementado e das substâncias cuja citotoxicidade se quer avaliar, sendo elas os substratos PD e IAA, a enzima HRP, e os dois sistemas completos PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂.

Os meios reacionais foram preparados da mesma maneira já relatada para o ensaio de avaliação da citotoxicidade pelo azul de Trypan em leucócitos (Sessão 4.4.4). A placa de cultura foi incubada durante 24 horas a 37 ° C e 5 % CO₂ e, após esse período, centrifugada a 2500 rpm durante 15 minutos. Na sequência, o meio de cultura foi posteriormente substituído por 200 µL de uma solução de trabalho de vermelho neutro 40 µg/mL em meio RPMI previamente suplementado. As células foram incubadas durante 3 horas para que ocorresse a incorporação do vermelho neutro pelas células viáveis a 37°C e 5% CO₂.

Após uma nova centrifugação sob as mesmas condições mencionadas anteriormente, 15 minutos a 2500 rpm, o meio foi então removido e as células lavadas com tampão PBS e, posteriormente, com 200 µL de uma solução álcool-ácido contendo ácido acético 1% e álcool 50%, também designada solução extratora do vermelho neutro. A placa foi agitada por 15 minutos e a leitura da densidade óptica efetuada em 540 nm utilizando um leitor de ELISA. Os experimentos foram realizados em triplicata e com esses valores de absorbância foi calculada a porcentagem de viabilidade celular para cada meio reacional tendo como referência o controle negativo de morte celular (viabilidade = 100%) da mesma maneira como realizado para a metodologia do MTT (Equação 6). (BORENFREUND; PUERNER, 1984; BORENFREUND; BABICH, 1987; BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988; BABICH; BORENFREUND, 1991; ROGERO, et al., 2003; REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008; MALEK et al., 2009; MALEK et al., 2011).

Com relação às linhagens L929 e MDA-MB-231 foram utilizadas 1×10^5 células/mL em um volume final de 200 µL/poço e o processo de incubação foi

realizado seguindo a metodologia descrita o MTT (Sessão 4.4.5). Após a incubação com as substâncias a serem testadas, o meio de cultura foi removido para a adição aos poços da solução de trabalho de vermelho neutro 40 µg/mL, sem haver a necessidade de centrifugação. Os demais procedimentos realizados foram semelhantes aos relatados para avaliação da citotoxicidade pelo VN em células sanguíneas, sendo a porcentagem de viabilidade celular determinada segundo a Equação 10.

4.5 Análise microscópica das alterações morfológicas induzidas pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂

As alterações morfológicas sofridas pelas células MDA-MB-231 mediadas pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂ foram avaliadas utilizando a coloração de May Grunwald-Giemsa. Para a realização desse ensaio foram utilizadas lamínulas de vidro para microscopia, redondas, de 13 mm de diâmetro (GLASSCYTO), previamente lavadas, desengorduradas mediante imersão em uma solução álcool-éter (1:2) durante 24 horas, esterilizadas em autoclave e, posteriormente, adicionadas aos poços da placa de cultivo de 24 poços. As células MDA-MB-231 foram então transferidas para a placa de 24 poços contendo as lamínulas e incubadas na presença de 500 µL de meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (solução estabilizada de penicilina (10.000 U/mL)/estreptomicina (10 mg/mL)) e 1,6% de L-glutamina (200 mM) durante 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Foi utilizada nos experimentos uma concentração de 1×10^5 células/ mL por poço, sendo os ensaios realizados em triplicata.

Após 24 horas de incubação, o meio de cultura de todos os poços foi removido e as células incubadas com as substâncias cuja ação se buscava avaliar, sendo os meios reacionais preparados da mesma forma como explicado no tópico 4.4.1. A placa foi novamente incubada durante 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após essa etapa de incubação o meio reacional foi removido e as lamínulas cuidadosamente retiradas dos poços da placa, com o auxílio de uma pinça, e colocadas sobre lâminas para serem posteriormente coradas.

Cobriram-se as lamínulas com o corante May Grunwald durante 3 a 4 minutos tomando-se o cuidado para que todas as lamínulas ficassem completamente cobertas pelo corante. Após essa etapa adicionou-se água destilada sobre o corante May Grunwald em uma quantidade aproximadamente igual a que havia sido adicionada para o corante. Após exatamente 1 minuto a solução May Grunwald-água foi desprezada e as lamínulas foram cobertas com o corante Giemsa diluído durante aproximadamente 15 minutos. Após esse tempo as lamínulas foram lavadas em água corrente e após a secagem foram coladas utilizando o bálsamo do Canadá em lâminas previamente identificadas. As lamínulas foram observadas em microscópio óptico (OLYMPUS) e fotografadas utilizando uma câmera para microscópio ocular digital (BIOVAL). Após a captura, as imagens foram processadas utilizando o software ImageJ versão 1.47 (Bethesda, Maryland, USA).

4.6 Ensaio de apoptose por citometria de fluxo

O ensaio foi realizado utilizando o kit I para detecção de apoptose FITC-Anexina V (BD-PHARMINGEN) que contém em sua composição a anexina V conjugada com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e o iodeto de propídeo (PI). Esse kit permite quantificar a porcentagem de células dentro de uma população que pode sofrer apoptose, o que está associado à alteração na distribuição dos constituintes da membrana citoplasmática durante etapas iniciais da apoptose, com o consequente deslocamento da fosfatidilserina (FS) da porção citosólica da membrana para a porção externa da mesma, permitindo a sua ligação à anexina V-FITC.

Neste estágio as células ainda mantêm a integridade da membrana celular, o que impede a entrada do iodeto de propídeo (PI), que, no entanto, penetra através da membrana em estágios mais tardios da apoptose celular, tornando-as duplo-marcadas. Em células necróticas ocorre a ruptura precoce da membrana celular com a consequente marcação pelo PI, sem haver a exposição da FS. Portanto, esse ensaio permite a quantificação de células em estágios iniciais de apoptose, bem como sua diferenciação daquelas em estágios tardios de apoptose ou em necrose.

O ensaio de apoptose foi realizado com as células MDA-MB-231 que foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^5 células/mL e incubadas durante 24 horas na presença de meio DMEM. Após esse período de incubação o meio de cultura foi substituído pelas substâncias em estudo. Dessa forma, as células foram incubadas com os substratos, PD ou IAA, nas concentrações de 1, 2 e 4 mM na ausência e na presença da enzima HRP (2×10^{-6} M) que também foi testada separadamente. Utilizaram-se como controle negativo as células incubadas somente com o meio de cultura e como controle positivo o cloreto de cádmio (CdCl_2) 2 mM. O volume final do meio reacional foi completado para 1 mL com o meio de cultura DMEM.

Após esse período de incubação coletou-se em tubos de ensaio de fundo redondo produzidos em poliestireno, o meio de cultura contido em cada poço. As células aderidas foram lavadas através da adição de 1 mL de tampão PBS 1X pH 7,4 aos poços da placa e, posteriormente, tratadas com 300 μL de uma solução 0,5% tripsina- EDTA (10X) diluída (1:10) em tampão PBS 1X estéril, sendo transferidas para os mesmos tubos que foram centrifugados a 1800 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com tampão PBS 1X pH 7,4 gelado (4°C) mediante centrifugação a 1800 rpm durante 10 minutos. Esse procedimento foi repetido e, posteriormente, as células foram ressuspensas em 100 μL de uma solução de tampão de ligação (*binding buffer* 10X: 0,1 M HEPES/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl_2) diluída (1:100) em água ultrapurificada.

A avaliação da morte celular foi realizada seguindo as especificações do Kit, sendo assim, a cada tubo foram adicionados 1 μL de anexina-FITC, 1 μL de iodeto de propídeo (PI) e 8 μL da solução diluída do tampão de ligação. Os tubos foram incubados durante 15 minutos sob abrigo da luz e. Posteriormente, adicionou-se 100 μL de tampão de ligação e a intensidade de fluorescência relativa à marcação das células pelos fluorocromos anexina V-FITC e PI foi determinada utilizando o citômetro de fluxo BD FACScanto II (BD PHARMINGEN). A determinação da porcentagem de células não marcadas (vivas), células marcadas somente pela anexina V (apoptose recente) ou PI (necrose) ou duplo-marcadas (apoptose tardia) foi efetuada através do software FACSdiva v.6.1.3 (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Inicialmente as células foram selecionadas por distribuição de tamanho em gráficos de distribuição pontual definida pelos parâmetros área (FSC-A) e altura

(FSC-H). Em seguida, foi realizada a análise de distribuição pontual de fluorescência 1 (FL1- anexina V-FITC) *versus* fluorescência 3 (FL-2- iodeto de propídeo).

4.7 Análise estatística

Os resultados provenientes do ensaio para a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e delineamento das espécies produzidas pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂ foram expressos como média \pm desvio padrão e comparados utilizando o teste paramétrico de análise de variância ANOVA *one way* utilizando o software Origin[®] (Origin[®] software Inc., Northampton, MA, USA) sendo estabelecido o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados provenientes da avaliação da citotoxicidade mediada por esses mesmos sistemas enzima-substrato através das metodologias do azul de Trypan, MTT e vermelho neutro assim como da avaliação da apoptose também foram expressos como média \pm desvio padrão, e a análise estatística realizada pelo teste paramétrico ANOVA *one way* com pós-teste de comparação múltipla de Tukey. As comparações entre as metodologias usadas para avaliar a viabilidade celular foram realizadas através do teste ANOVA *two way* com pós-teste de Bonferroni. Essas análises foram realizadas utilizando o programa estatístico Graphpad Prism 5[®] (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) considerando significativos os valores de $p < 0,05$. O número de experimentos (n) está representado em cada figura.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da produção de ERO pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂

A avaliação da oxidação do IAA pela HRP, em reação sem adição de peróxido, através do uso da DCFH-DA permitiu evidenciar a formação de ERO, uma vez que o meio reacional que continha o sistema enzima-substrato completo apresentou um aumento na absorbância em relação à reação que só continha o IAA (Figura 15). Na concentração de IAA 3 mM houve uma maior diferença entre os valores de absorbância do meio reacional contendo o sistema completo (IAA + HRP) (Figura 15- curva (▲)) e o meio contendo somente o substrato IAA 3 mM (Figura 15- curva (Δ)), e, portanto um aumento mais expressivo na formação de radicais livres quando comparado à reação contendo o IAA na concentração de 1 mM, como evidenciado pela diferença entre as curvas (●) e (○) (Figura 15). A formação de ERO na reação aconteceu de maneira rápida, aumentando nos primeiros 20 minutos, quando atinge níveis estáveis até os 70 minutos.

A combinação PD/HRP/O₂ em reação independente de peróxido também levou à produção de ERO (Figura 16). No entanto, a diferença entre os valores de absorbância do meio reacional contendo o sistema completo (PD + HRP) (Figura 16- curva (▲)) e o meio contendo somente a PD na concentração de 3 mM (Figura 16- curva (Δ)) não mostrou-se superior à apresentada pela PD quando testada na concentração de 1 mM. Assim, o uso de uma concentração mais elevada da PD (3 mM) não levou à formação de ERO em maior proporção. A quantidade de ERO formada no meio reacional contendo a PD 3 mM e a HRP (Figura 16- curva (▲)) mostrou-se constante durante todo o tempo em que a reação foi monitorada.

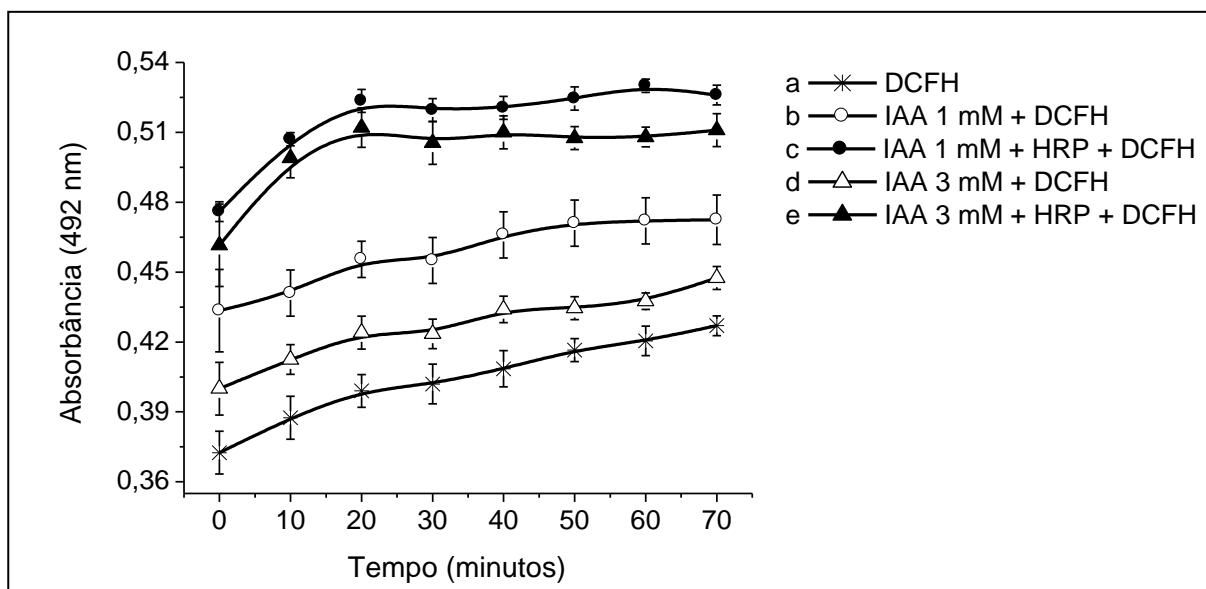


FIGURA 15: Produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação do IAA pela HRP na ausência de peróxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (●) e (▲) não apresentam diferença estatisticamente significativa em qualquer tempo de reação, $p<0,05$.

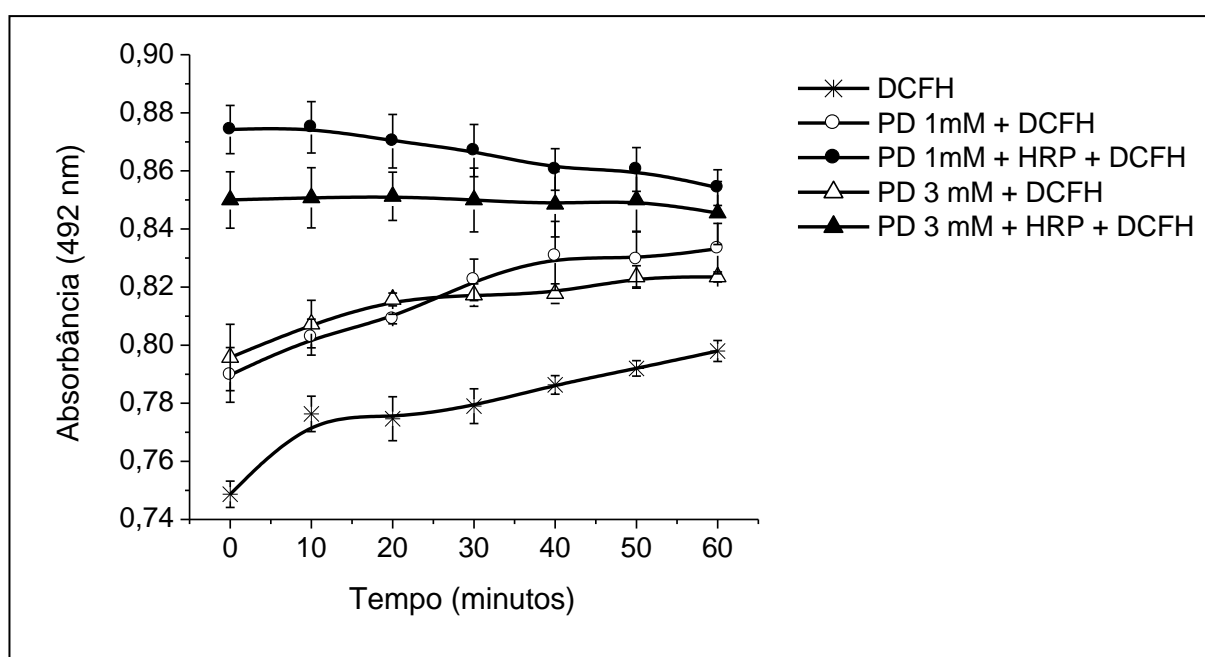


FIGURA 16: Produção de ERO detectados pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação da PD pela HRP na ausência de peróxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (●) e (▲) não apresentam diferença estatisticamente significativa em qualquer tempo de reação, o mesmo acontece entre as curvas (○) e (Δ) e entre as curvas (○) e (▲) a partir dos 40 minutos, $p<0,05$.

Com a finalidade de verificar a melhor proporção enzima-substrato a ser utilizada nos estudos posteriores de viabilidade celular para favorecer a produção de ERO, foram realizados testes em várias concentrações do substrato de interesse, a PD, sendo a HRP testada na concentração de 2×10^{-6} M. A escolha dessas concentrações foi baseada em estudos preliminares realizados por Rodrigues (2007). Como pode ser verificado na Figura 17, a concentração da PD mais efetiva para a produção de radicais foi a de 1 mM. Foi calculada, para cada concentração do substrato, a variação de absorvância através da diferença entre os valores de absorvâncias provenientes da reação com e sem a adição da HRP.

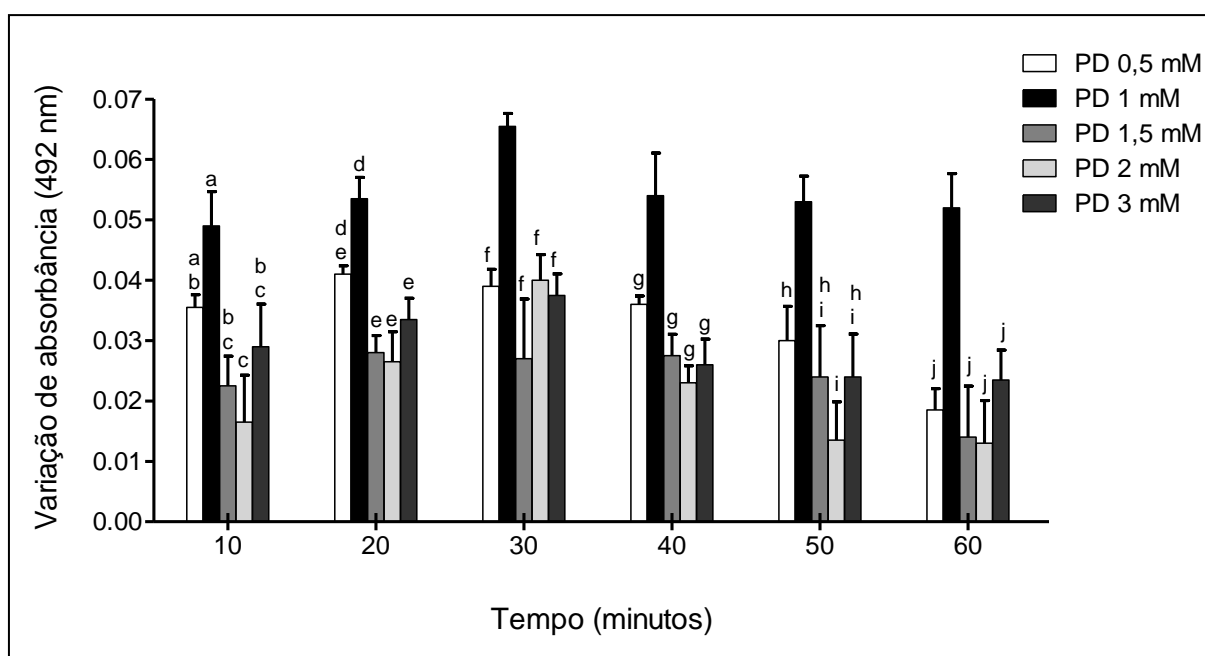


FIGURA 17: Variação de absorvância entre os meios reacionais contendo a PD na ausência e na presença da enzima para cada concentração do substrato. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). Letras iguais representam situações que não apresentam diferença estatisticamente significativa. Compararam-se os cinco grupos apresentando diferentes concentrações do substrato PD (0,5; 1; 1,5; 2 e 3) em determinados intervalos de tempo (10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos), $p < 0,05$.

O mesmo ensaio foi realizado para o IAA (dados não apresentados) e ao contrário da PD, a concentração que se mostrou mais efetiva para a produção de ERO foi a de 3 mM. Na tabela 1 foram apresentadas as variações de absorvância para a PD e para o IAA nas concentrações de 1,0 e 3,0 mM, 30 minutos após o início da reação. Essa variação foi calculada através da diferença entre as absorvâncias dos meios reacionais com e sem a presença da HRP. A variação da

absorbância foi maior quando se utilizou a concentração de 1 mM para a PD e 3 mM para o IAA indicando que essas possivelmente correspondem às concentrações mais efetivas. A variação da absorbância apresentada pela adição da HRP ao meio contendo o IAA foi superior a apresentada pela adição da mesma enzima ao meio contendo a PD, indicando que a oxidação do IAA pela HRP produz ERO em maior proporção.

TABELA 1: Comparação da produção de ERO pela oxidação da PD e do IAA pela HRP detectada pelo ensaio da diclorofluoresceína (DCFH) 30 minutos após o início da reação

PD		IAA	
Concentração	Variação na Absorbância (492 nm)	Concentração	Variação na Absorbância (492 nm)
1,0 mM	0,0445 ± 0,00898	1,0 mM	0,0645 ± 0,0032
3,0 mM	0,0328 ± 0,00386	3,0 mM	0,0820 ± 0,0076

5.2 Ação de “scavengers” sobre as ERO formadas pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA /HRP/O₂

5.2.1 Catalase

As concentrações da catalase (CAT) assim como dos demais varredores, superóxido dismutase (SOD) e formato de sódio (FS) a serem usados nos experimentos foram determinadas de acordo com um estudo anterior realizado por Kim et al. (2006). A adição da catalase nas concentrações de 100 e 500 U/mL diminuiu de maneira considerável a absorbância da reação PD 1 mM/HRP quando adicionadas ao meio, porém a concentração de catalase de 1000 U/mL não demonstrou efeito sobre as ERO produzidas (Figura 18). Já na reação com concentração maior de PD (3 mM) não foi observada qualquer redução na produção de ERO, fato que pode estar relacionado a uma baixa concentração de catalase

para uma grande quantidade de ERO sendo formadas (Figura 19). Como a catalase é um antioxidante que converte o peróxido de hidrogênio em O_2 e H_2O , presume-se que tenha ocorrido a produção dessa espécie reativa durante a oxidação da PD catalisada pela HRP.

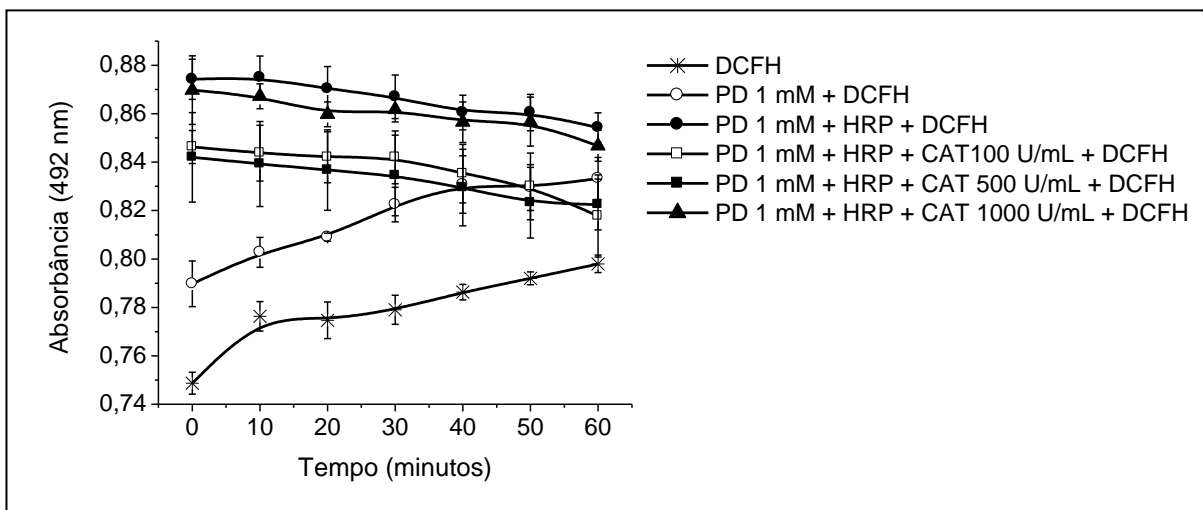


FIGURA 18: Ação da catalase na produção de ERO detectados pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação da PD 1 mM pela HRP na ausência de peróxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (\bullet) e (\blacktriangle) não apresentam diferença estatisticamente significativa em qualquer tempo de reação, o mesmo acontece entre as curvas (\square) e (\blacksquare), $p<0,05$.

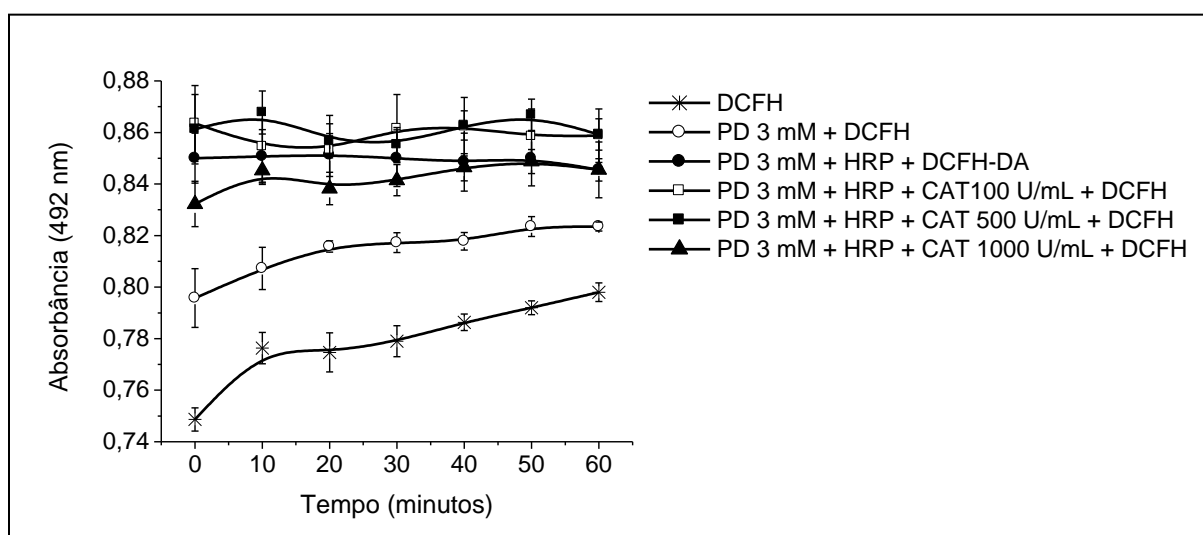


FIGURA 19: Ação da catalase na produção de espécies reativas de oxigênio detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação da PD 3 mM pela HRP na ausência de peróxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (\bullet), (\square), (\blacksquare) e (\blacktriangle) não apresentam diferença estatisticamente significativa em qualquer tempo de reação, $p<0,05$.

Quando se considera a reação de oxidação do IAA, testado nas concentrações de 1 mM e 3 mM, pela HRP, pôde ser observado que nos 40 minutos iniciais da reação não houve ação da catalase como varredora de ERO. Já no tempo final, duas concentrações da catalase (100 e 500 U/mL) se mostraram eficientes na diminuição da absorbância e, conseqüentemente, da quantidade de ERO formada na reação (Figura 20).

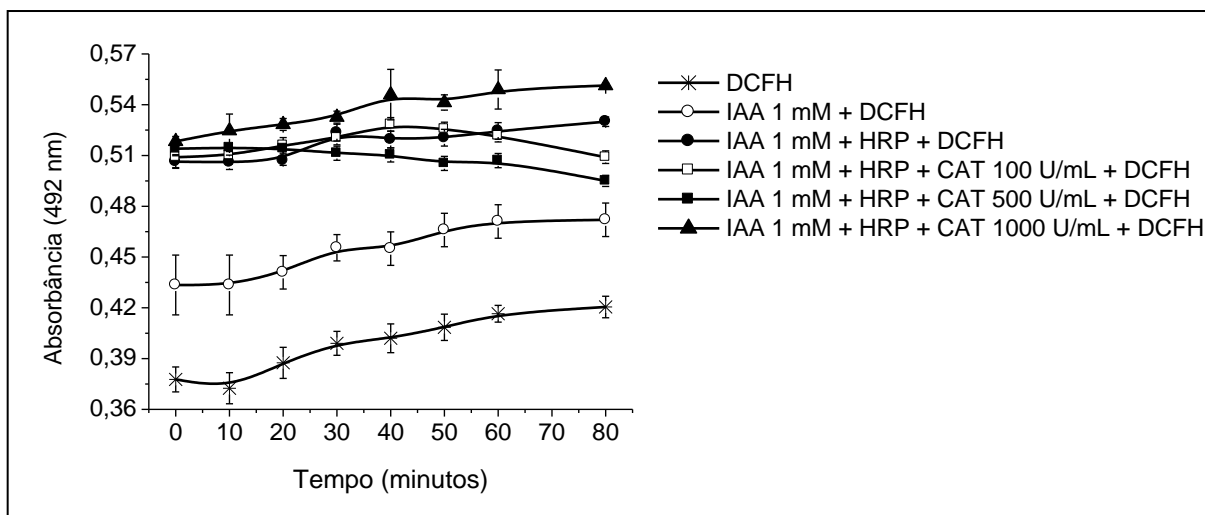


FIGURA 20: Ação da catalase na produção de ERO detectados pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação do IAA 1 mM pela HRP na ausência de peróxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (\bullet), (\square), (\blacksquare) e (\blacktriangle) não apresentam diferença estatisticamente significativa nos 40 minutos iniciais de reação, o mesmo acontece com as curvas (\bullet) e (\square) até os 60 minutos, $p<0,05$.

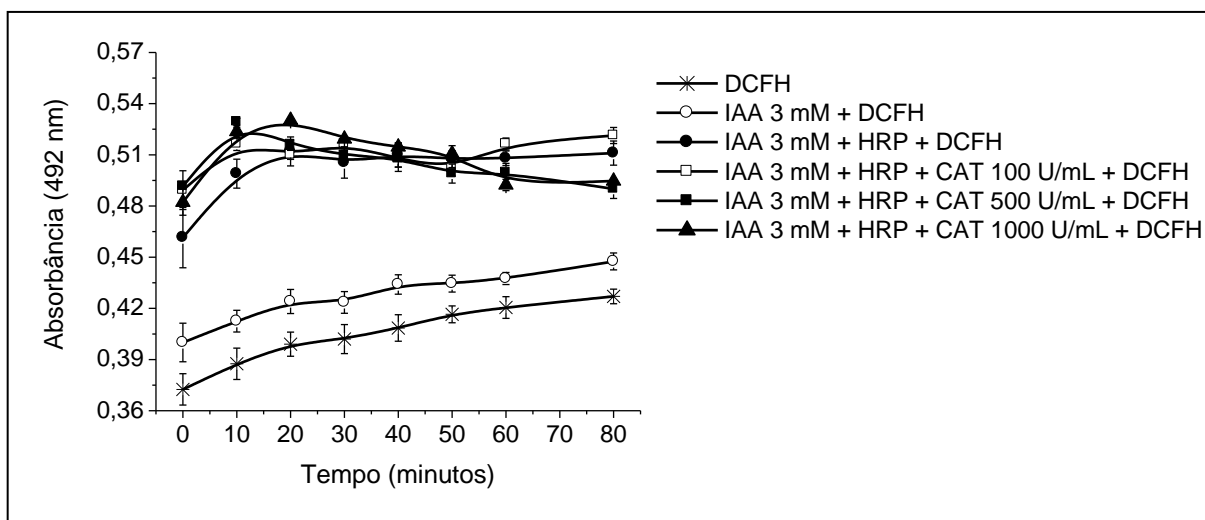


FIGURA 21: Ação da catalase na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação do IAA 3 mM pela HRP na ausência de peróxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (\bullet), (\square), (\blacksquare) e (\blacktriangle) não apresentam diferença estatisticamente significativa nos 50 minutos iniciais de reação, o mesmo acontece com as curvas (\bullet) e (\square) até os 60 minutos, $p<0,05$.

5.2.2 Formato de sódio

O formato de sódio quando adicionado ao meio de reação contendo HRP e PD em qualquer uma das duas concentrações utilizadas, não proporcionou queda na absorbância, demonstrando que, provavelmente, não houve formação do radical hidroxila nesta reação (Figuras 22 e 23).

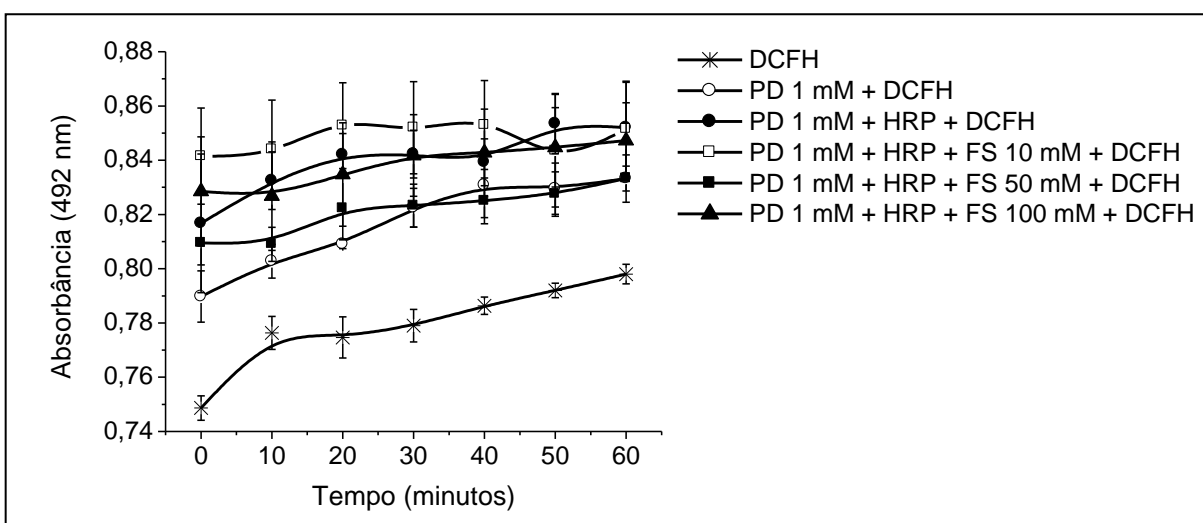


FIGURA 22: Ação do formato de sódio na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação da PD 1mM pela HRP na ausência de peróxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (\bullet), (\square), (\blacksquare) e (\blacktriangle) não apresentam diferença estatisticamente significativa em qualquer tempo de reação, $p<0,05$.

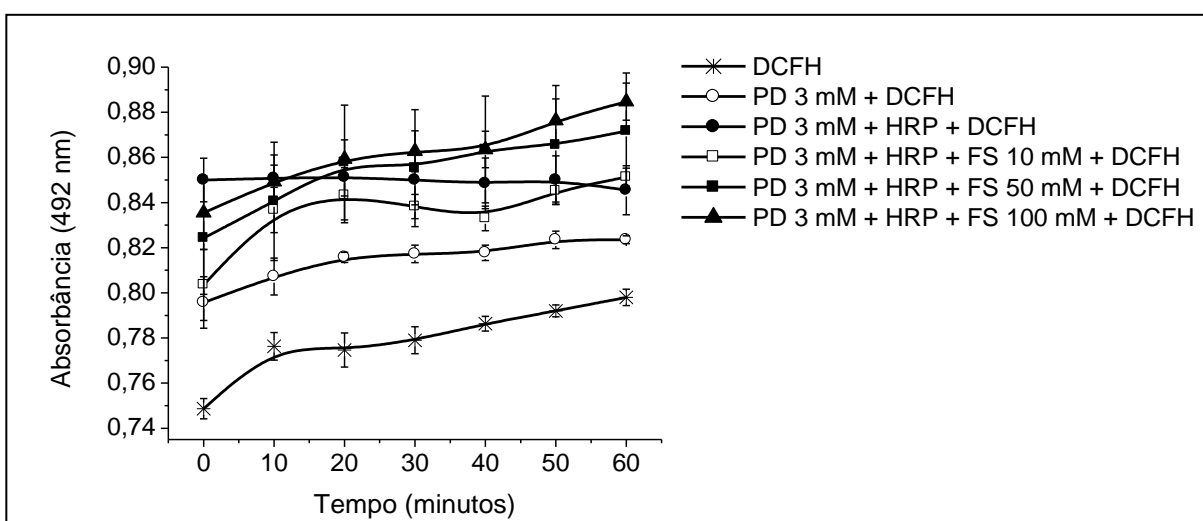


FIGURA 23: Ação do formato de sódio na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação da PD 3mM pela HRP na ausência de peróxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (\bullet), (\square), (\blacksquare) e (\blacktriangle) não apresentam diferença estatisticamente significativa em qualquer tempo de reação, $p<0,05$.

Na oxidação do IAA nas concentrações de 1 mM e 3 mM pela HRP, o formato de sódio não apresentou efeito “scavenger” de radicais, uma vez que não levou a uma redução significativa na absorbância em nenhuma das concentrações testadas (Figuras 24 e 25).

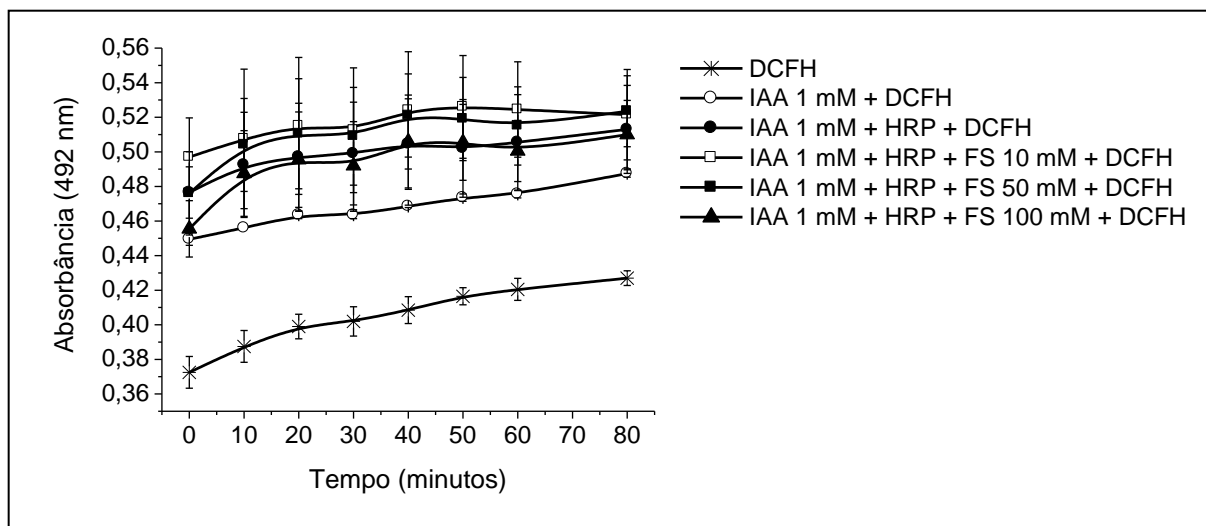


FIGURA 24: Ação do formato de sódio na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação do IAA 1 mM pela HRP na ausência de peróxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (●), (□), (■) e (▲) não apresentam diferença estatisticamente significativa em qualquer tempo de reação, $p<0,05$.

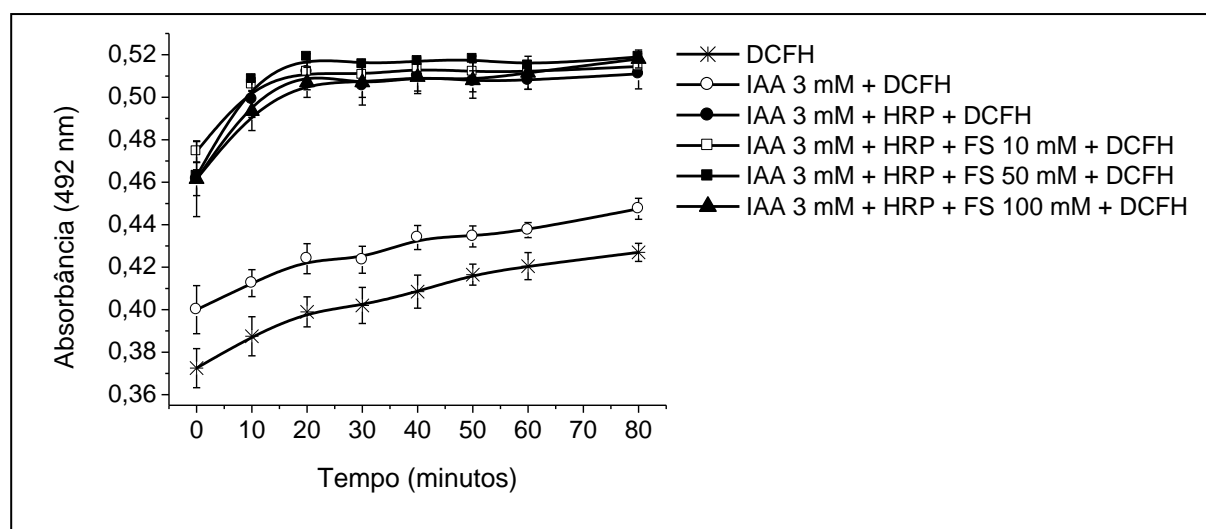


FIGURA 25: Ação do formato de sódio na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação do IAA 3 mM pela HRP na ausência de peróxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (●), (□), (■) e (▲) não apresentam diferença estatisticamente significativa em qualquer tempo de reação, $p<0,05$.

5.2.3 Superóxido dismutase

A adição de superóxido dismutase (SOD) ao meio de reação contendo a DCFH, PD 1 mM e HRP promoveu uma redução significativa na absorbância para as três concentrações de SOD testadas como mostrado na Figura 26, e, portanto na detecção de espécies reativas de oxigênio, o que representa um indício de que a oxidação da PD promovida pela HRP leva à formação de radical ânion superóxido. Porém, não houve diferença significativa entre as concentrações de SOD utilizadas.

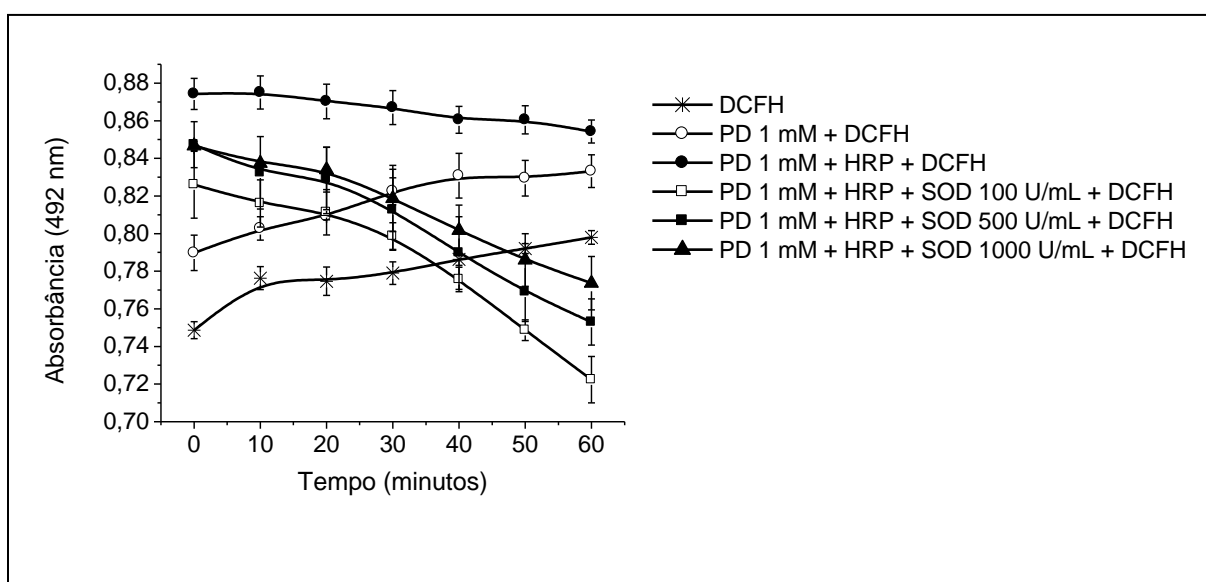


FIGURA 26: Ação da superóxido dismutase na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação da PD 1 mM pela HRP na ausência de peróxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (□), (■) e (▲) não apresentam diferença estatisticamente significativa até os 50 minutos de reação, a partir desse tempo há diferença estatisticamente significativamente as curvas (□) e (▲), $p<0,05$.

Entretanto ao ser adicionada a SOD, em qualquer concentração, ao meio reacional contendo a PD na concentração de 3 mM, a HRP e a DCFH, não foi detectada uma alteração significativa nos níveis de espécies reativas de oxigênio formadas durante a reação (Figura 27), o que pode estar associado a uma formação menos expressiva de ERO quando se utiliza uma maior concentração da PD, fato esse observado e comentado anteriormente (Figura 16 e 17).

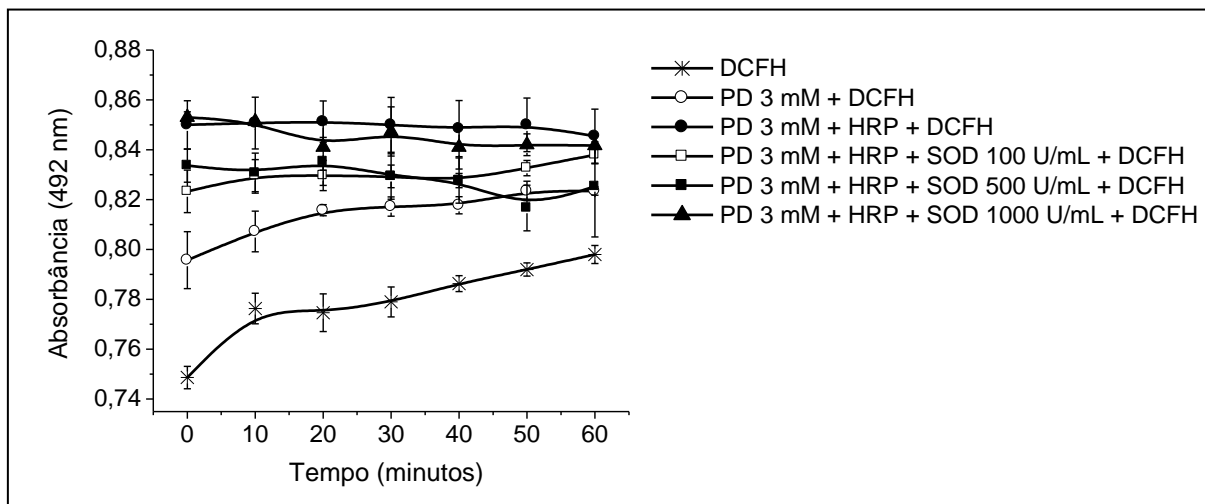


FIGURA 27: Ação da superóxido dismutase na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação da PD 3 mM pela HRP na ausência de peróxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (\bullet), (\square), (\blacksquare) e (\blacktriangle) não apresentam diferença estatisticamente significativa em qualquer tempo de reação, $p < 0,05$.

A SOD parece não afetar a produção de ERO geradas na reação de oxidação do IAA catalisada pela HRP, independente da concentração desse substrato utilizada, conforme se observa nas Figuras 28 e 29. Dessa forma, é possível inferir que o radical ânion superóxido provavelmente não é produzido durante essa reação.

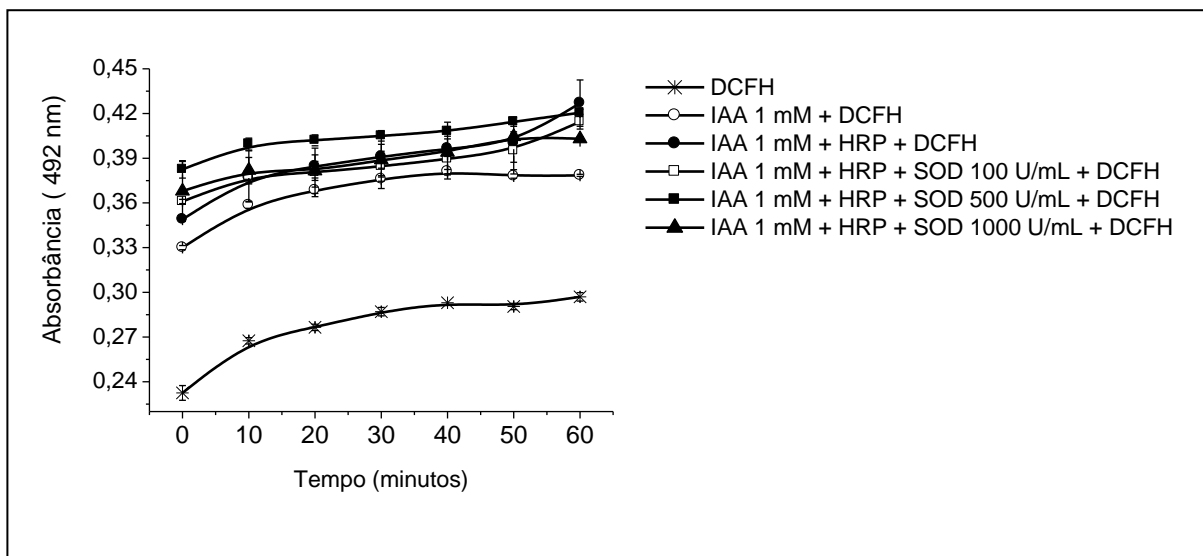


FIGURA 28: Ação da superóxido dismutase na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação do IAA 1 mM pela HRP na ausência de peróxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (\bullet), (\square), (\blacksquare) e (\blacktriangle) não apresentam diferença estatisticamente significativa em qualquer tempo de reação, $p < 0,05$.

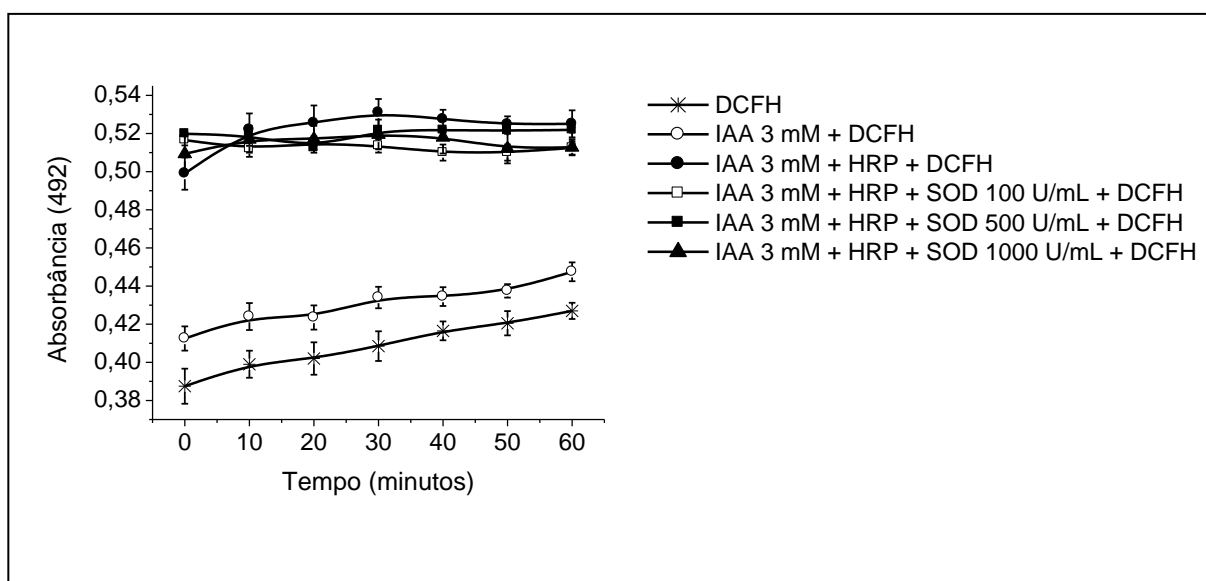


FIGURA 29: Ação da superóxido dismutase na produção de ERO detectadas pela técnica da diclorofluoresceína na reação de oxidação do IAA 3 mM pela HRP na ausência de peróxido. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (\bullet), (\square), (\blacksquare) e (\blacktriangle) não apresentam diferença estatisticamente significativa em qualquer tempo de reação, $p < 0,05$.

5.3 Avaliação da citotoxicidade dos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA /HRP/O₂

5.3.1 Leucócitos

Com o intuito de avaliar a ação citotóxica dos dois sistemas foi realizado um estudo inicial em leucócitos obtidos do sangue periférico de doadores voluntários. Para verificar o efeito da concentração do substrato na citotoxicidade dos sistemas, o IAA e a PD foram testados nas concentrações de 1; 1,5; 2; 2,5; 3 e 4 mM sendo a concentração da enzima HRP mantida fixa em 2×10^{-6} M.

A oxidação do substrato IAA pela HRP, provavelmente levou a produção de substâncias que foram capazes de induzir citotoxicidade em leucócitos detectada pelas metodologias do azul de Trypan (AT), MTT e vermelho neutro (VN). Dessa forma, observou-se uma redução significativa na viabilidade celular na presença do sistema IAA/HRP/O₂ em comparação ao controle negativo, assim como em comparação com o meio reacional contendo somente a HRP ou o IAA (Figura 30- A, B e C). No entanto, não foi observada diferença significativa entre os meios contendo o par IAA/HRP nas concentrações de 1mM a 4 mM. A citotoxicidade mediada pelo sistema IAA/HRP/O₂ foi semelhante à apresentada pelo CdCl₂ (2 mM). Entretanto, observou-se que o IAA, quando administrado na ausência da enzima, em todas as concentrações testadas apresentou citotoxicidade considerável, ao contrário da HRP, cujo uso isolado não demonstrou toxicidade relevante.

O sistema PD/HRP/O₂ também se apresentou citotóxico frente a leucócitos induzindo uma redução significativa na viabilidade celular quando comparado ao controle negativo e aos meios contendo apenas a HRP isoladamente. A diferença entre a viabilidade celular dos meios contendo o par PD/HRP e os meios reacionais apresentando apenas a PD foi significativa para todas as concentrações da PD testadas. Contudo, o sistema apresentou-se predominantemente menos citotóxico em comparação ao CdCl₂. A PD, quando testada isoladamente, na concentração de 1 mM não apresentou citotoxicidade relevante, o que foi evidenciado por todas as três metodologias, no entanto, a partir dessa concentração tornou-se tóxica para os leucócitos. Esse aumento na citotoxicidade mediante aumento na concentração da PD foi também observado na presença da enzima HRP (Figura 31- A, B e C).

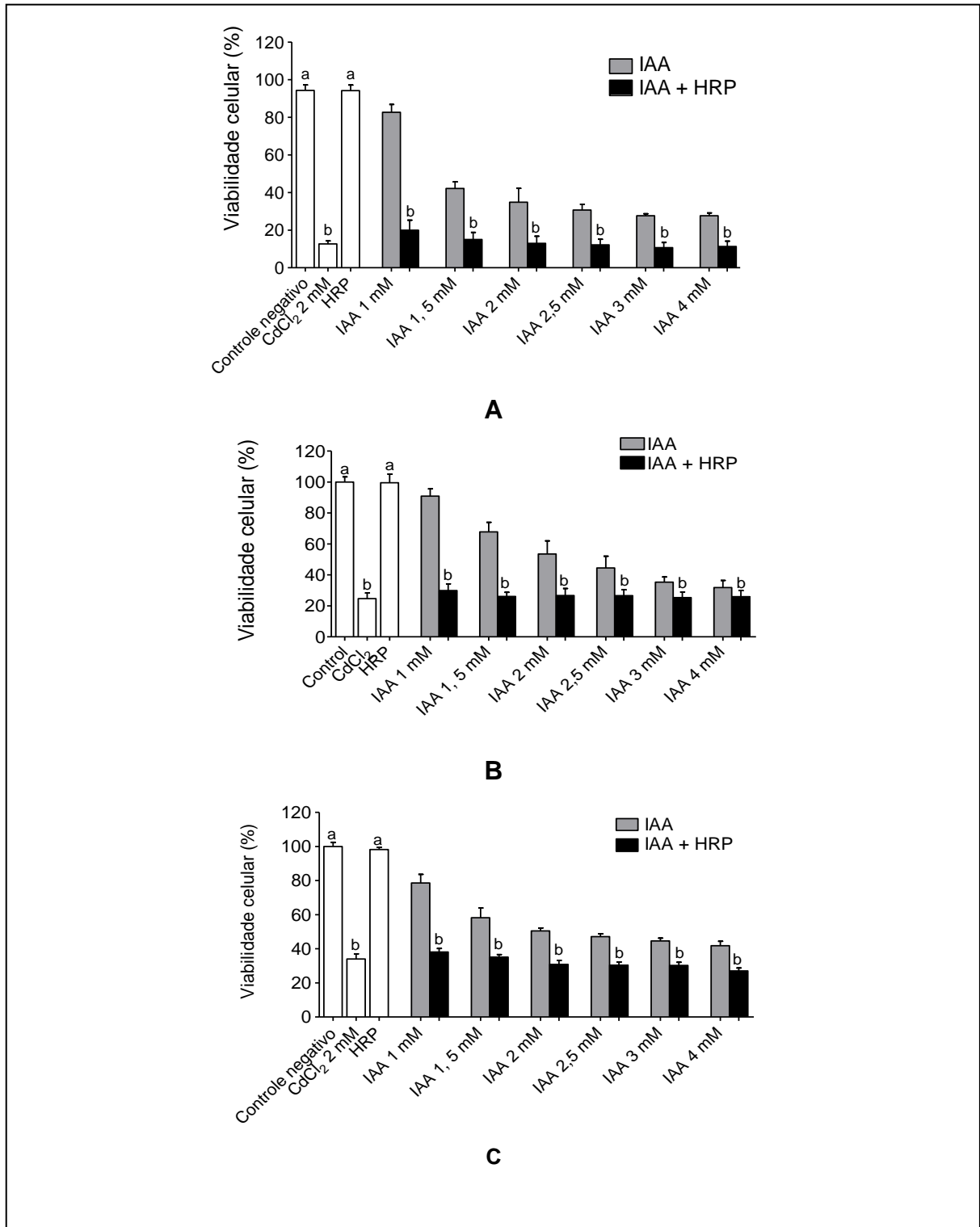


FIGURA 30: Avaliação da citotoxicidade em leucócitos provenientes de doadores humanos voluntários mediada pela oxidação do IAA pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através das metodologias do AT (A) MTT (B) e VN (C). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). Letras iguais representam situações que não apresentam diferença estatisticamente significativa. Comparou-se o controle negativo de morte celular com os demais meios reacionais; o controle positivo, CdCl₂, com os demais meios reacionais; o meio reacional contendo somente a HRP com os demais; o meio reacional contendo somente o substrato IAA com o que contém o sistema IAA/HRP completo para cada concentração do substrato; os meios reacionais contendo o sistema IAA/HRP nas diferentes concentrações do substrato, $p < 0,05$.

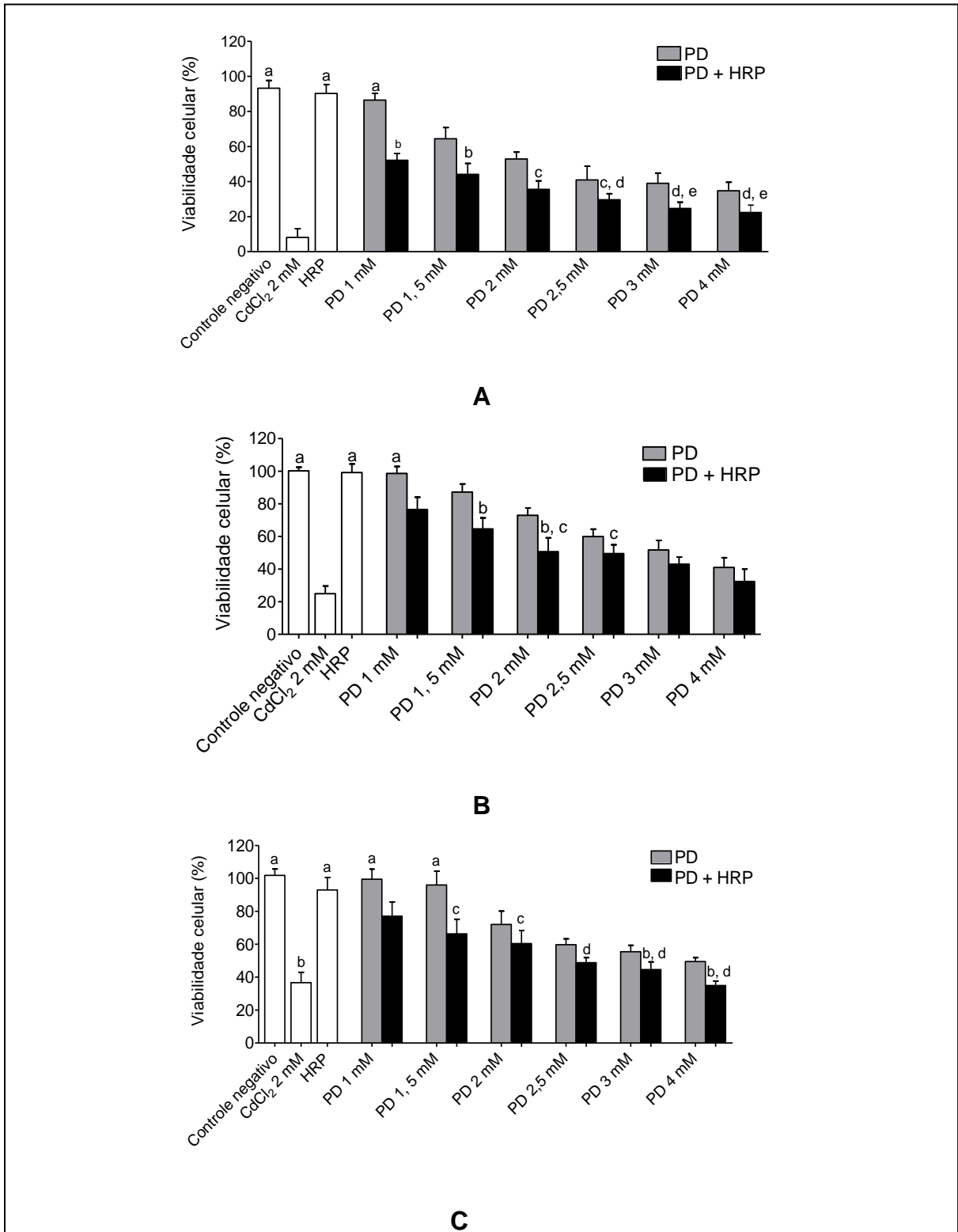


FIGURA 31: Avaliação da citotoxicidade em leucócitos provenientes de doadores humanos voluntários mediada pela oxidação da PD pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através das metodologias do AT (A) MTT (B) e VN (C). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). Letras iguais representam situações que não apresentam diferença estatisticamente significativa. Comparou-se o controle negativo de morte celular com os demais meios reacionais; o controle positivo, CdCl₂, com os demais meios reacionais; o meio reacional contendo somente a HRP com os demais; o meio reacional contendo somente o substrato PD com o que contém o sistema PD/HRP completo para cada concentração do substrato; os meios reacionais contendo o sistema PD/HRP nas diferentes concentrações do substrato, $p < 0,05$.

5.3.2 Células L929

A citotoxicidade do sistema IAA/HRP/O₂ foi também avaliada em células L929 através das metodologias do MTT e do VN e assim como observado para os leucócitos, esse sistema apresentou significativa toxicidade (Figura 32- A e B). Os meios reacionais contendo o sistema completo IAA/HRP/O₂ apresentaram valores de viabilidade celular significativamente inferiores ao do controle negativo de morte celular e ao dos meios reacionais contendo isoladamente a HRP ou o IAA em todas as concentrações testadas. O sistema IAA/HRP/O₂ apresentou citotoxicidade semelhante à apresentada pelo controle positivo de morte celular (CdCl₂) confirmando a elevada toxicidade desse sistema. Entretanto, não foi observada diferença significativa entre a viabilidade celular dos meios que continham o sistema enzima-substrato completo, indicando que o aumento na concentração do IAA não induziu uma maior citotoxicidade.

Assim como observado para os leucócitos a enzima HRP, quando administrada de forma isolada, não induziu toxicidade, contudo, o uso isolado do substrato IAA, em todas as concentrações testadas, promoveu uma redução significativa na viabilidade celular, de maneira dose-dependente (Figuras 32- A e B).

A ação do sistema PD/HRP/O₂ sobre as células L929, foi avaliada através das metodologias do MTT e VN, e também permitiu evidenciar a citotoxicidade mediada pelos produtos da oxidação da PD pela HRP (Figura 33- A e B). Dessa forma, a viabilidade celular dos meios reacionais contendo o sistema completo PD/HRP/O₂, apresentou-se inferior a do controle negativo assim como a dos meios contendo apenas a HRP ou a PD isoladamente. Porém, comparado ao controle positivo de morte celular (CdCl₂), esse sistema enzima-substrato mostrou-se consideravelmente menos citotóxico, assim como quando comparado ao sistema IAA/HRP/O₂.

O uso isolado da PD, nas concentrações de 1; 1,5 e 2 mM, não induziu citotoxicidade frente a essa linhagem celular, o que difere do observado para o IAA que apresentou-se citotóxico na ausência da enzima, mesmo na menor concentração. A HRP, como mostrado nos outros ensaios, não apresentou citotoxicidade relevante. Foi também observado um significativo acréscimo na citotoxicidade mediada pelo sistema PD/HRP/O₂ com o aumento da concentração do substrato (Figuras 33- A e B).

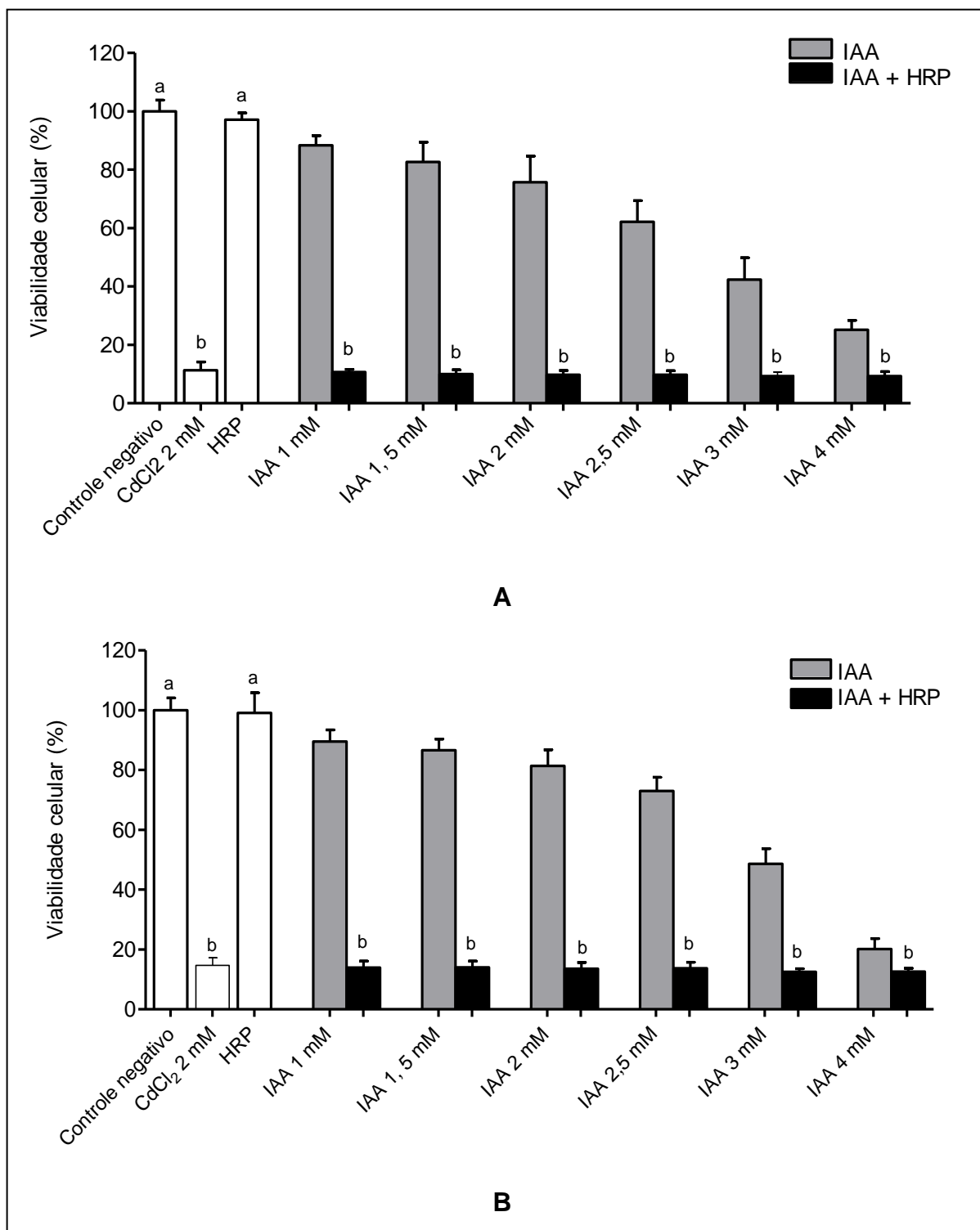


FIGURA 32: Avaliação da citotoxicidade em células L929 mediada pela oxidação do IAA pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através das metodologias do MTT (A) e VN (B). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). Letras iguais representam situações que não apresentam diferença estatisticamente significativa. Comparou-se o controle negativo de morte celular com os demais meios reacionais; o controle positivo, CdCl₂, com os demais meios reacionais; o meio reacional contendo somente a HRP com os demais; o meio reacional contendo somente o substrato IAA com o que contém o sistema IAA/HRP completo para cada concentração do substrato; os meios reacionais contendo o sistema IAA/HRP nas diferentes concentrações do substrato, $p < 0,05$.

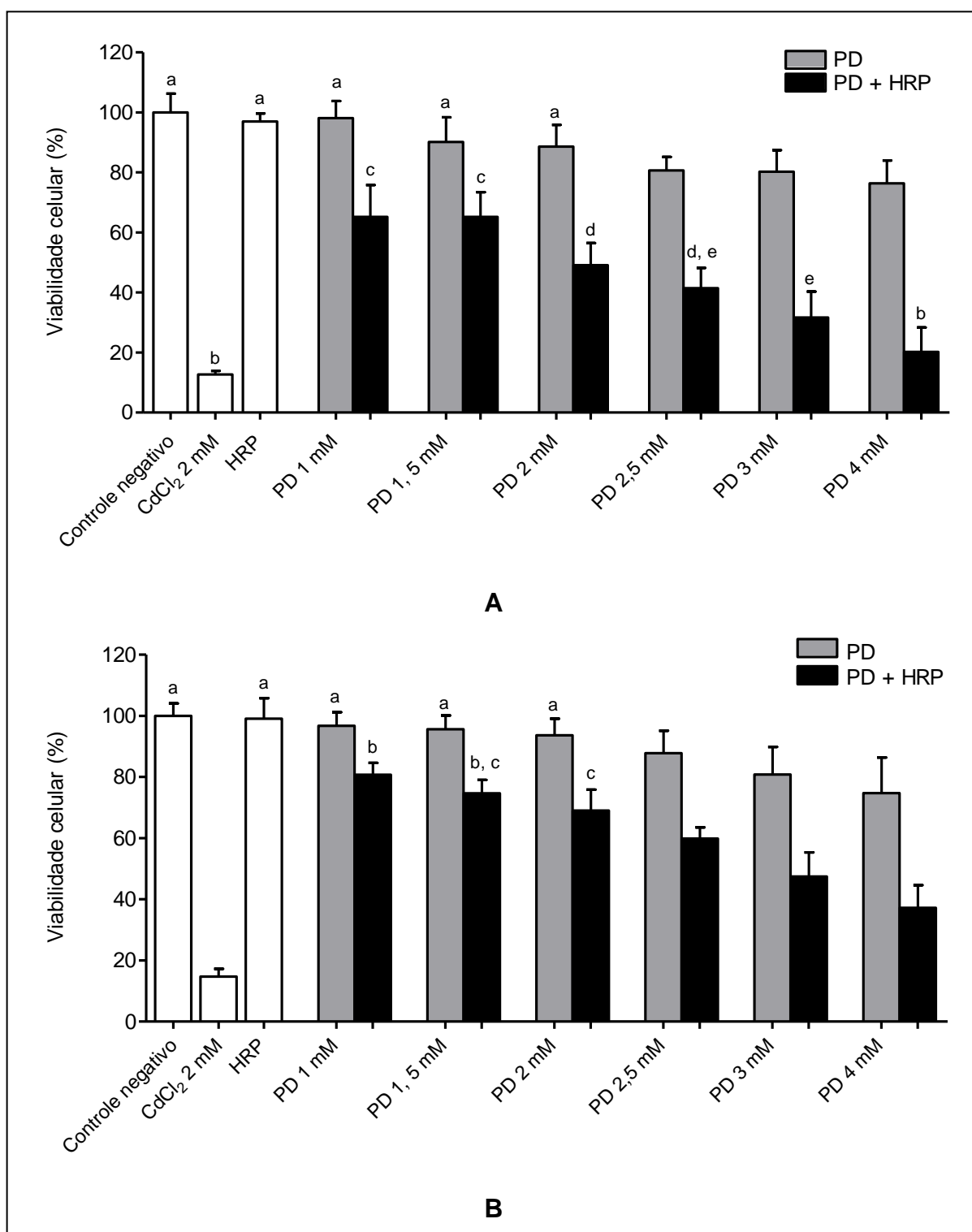


FIGURA 33: Avaliação da citotoxicidade em células L929 mediada pela oxidação da PD pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através das metodologias do MTT (A) e VN (B). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). Letras iguais representam situações que não apresentam diferença estatisticamente significativa. Comparou-se o controle negativo de morte celular com os demais meios reacionais; o controle positivo, o CdCl₂, com os demais meios reacionais; o meio reacional contendo somente a HRP com os demais; o meio reacional contendo somente o substrato PD com o que contém o sistema PD/HRP completo para cada concentração do substrato; os meios reacionais contendo o sistema PD/HRP nas diferentes concentrações do substrato, $p < 0,05$.

5.3.3 Células MDA-MB-231

A citotoxicidade dos sistemas IAA/HRP/O₂ e PD/HRP/O₂ foi então avaliada sobre células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 através das metodologias do MTT e do VN. O sistema IAA/HRP/O₂, bem como observado para os leucócitos e células L292, induziu uma redução significativa da viabilidade celular em comparação ao controle negativo de morte celular e ao meio reacional contendo somente a HRP ou o IAA. Assim, a diferença entre a viabilidade celular dos meios contendo o par IAA/HRP e os meios reacionais apresentando apenas o IAA foi significativa para todas as concentrações do IAA testadas, sendo esse resultado semelhante para as duas metodologias utilizadas (Figuras 34- A e B).

Quando comparado aos controles positivos de morte celular, o CdCl₂ (2 mM) e a DXR (15 µg/mL), esse sistema enzima-substrato revelou maior citotoxicidade para todas as concentrações do IAA testadas, as quais apresentaram valores de viabilidade celular estatisticamente semelhantes (Figuras 34- A e B). Entretanto, é possível observar que o substrato IAA, na ausência da enzima, mesmo na menor concentração, induziu uma redução significativa na viabilidade celular, o que não foi observado para a enzima HRP, que apresentou baixa citotoxicidade (Figura 34).

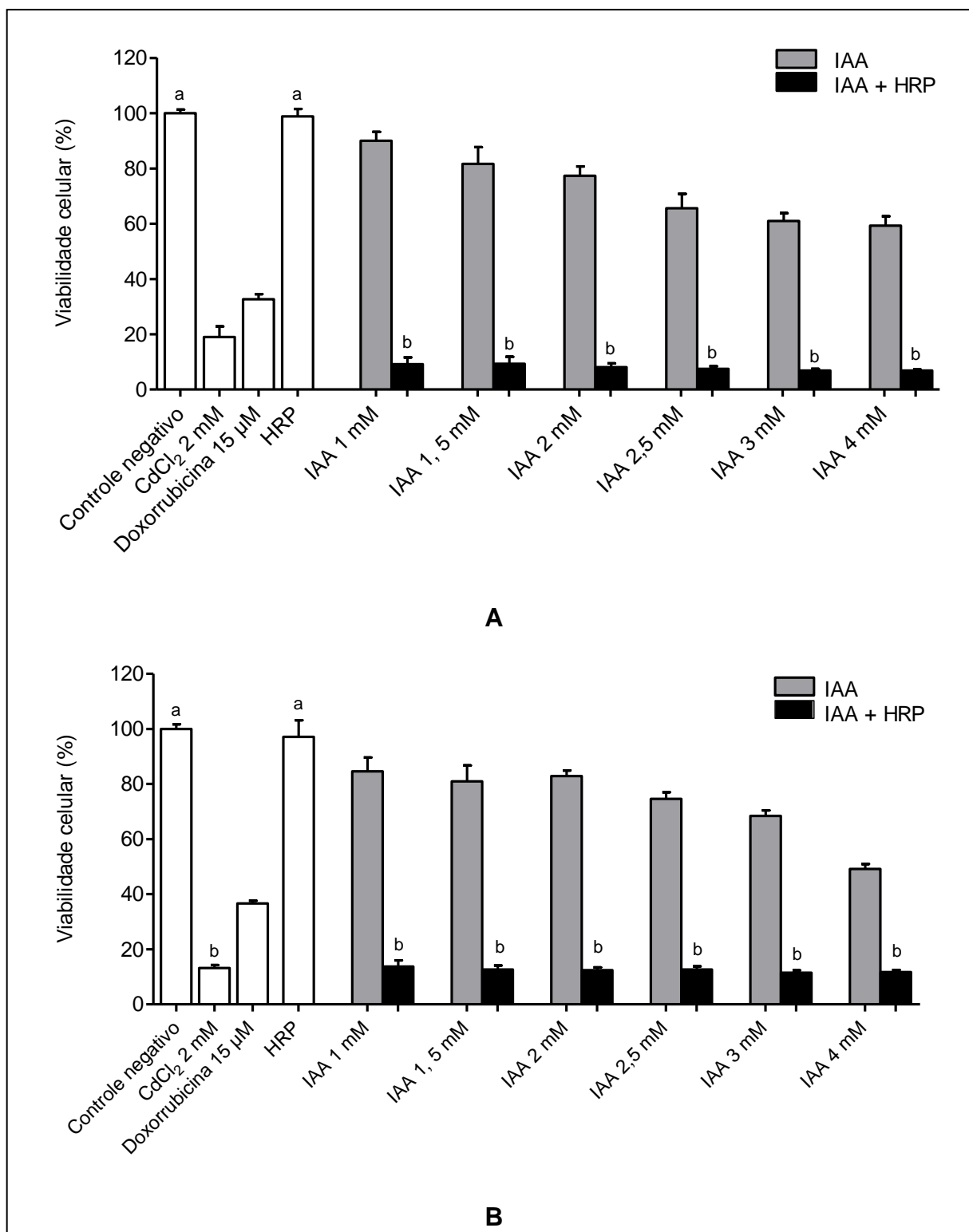


FIGURA 34: Avaliação da citotoxicidade em células MDA-MB-231 mediada pela oxidação do IAA pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através das metodologias do MTT (A) e VN (B). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). Letras iguais representam situações que não apresentam diferença estatisticamente significativa. Comparou-se o controle negativo de morte celular com os demais meios reacionais; os controles positivos, CdCl₂ e a Doxorubicina, com os demais meios reacionais; o meio reacional contendo somente a HRP com os demais; o meio reacional contendo somente o substrato IAA com o que contém o sistema IAA/HRP completo para cada concentração do substrato; os meios reacionais contendo o sistema IAA/HRP nas diferentes concentrações do substrato, $p < 0,05$.

A avaliação da citotoxicidade mediada pelo sistema PD/HRP/O₂ pelas metodologias do MTT e do VN foi realizada de forma semelhante ao descrito para o IAA. Assim como observado para o sistema IAA/HRP/O₂, a oxidação da PD pela HRP promoveu uma redução significativa na viabilidade celular quando comparada ao controle negativo e aos meios reacionais contendo somente a enzima ou a PD em todas as concentrações testadas (Figura 35- A e B).

Na metodologia do MTT os meios reacionais contendo o sistema enzima-substrato, em todas as concentrações do substrato testadas, apresentaram valores de viabilidade celular próximos à da DXR (15 µg/mL), não havendo diferença significativa entre eles. No entanto, com exceção da concentração de 4 mM, apresentaram menor citotoxicidade quando comparados ao meio contendo o CdCl₂ (Figura 35- A e B). Esses resultados foram diferentes dos obtidos pela avaliação da citotoxicidade através da metodologia do VN, que forneceu valores de viabilidade celular significativamente superiores aos apresentados pelo MTT para os meios reacionais contendo o sistema PD/HRP/O₂ completo.

O sistema IAA/HRP/O₂ quando comparado ao sistema PD/HRP/O₂ apresentou-se mais citotóxico para a linhagem tumoral MDA-MB-231, o que havia sido evidenciado para as outras linhagens celulares. Contudo, o próprio substrato IAA quando testado isoladamente apresentou uma considerável citotoxicidade (Figura 34- A e B), o que não foi evidenciado para a PD, que quando administrada nas concentrações de 1 mM e 1,5 mM, na ausência da enzima, não apresentou toxicidade relevante, não havendo diferença significativa em relação ao controle negativo (Figura 35- A e B).

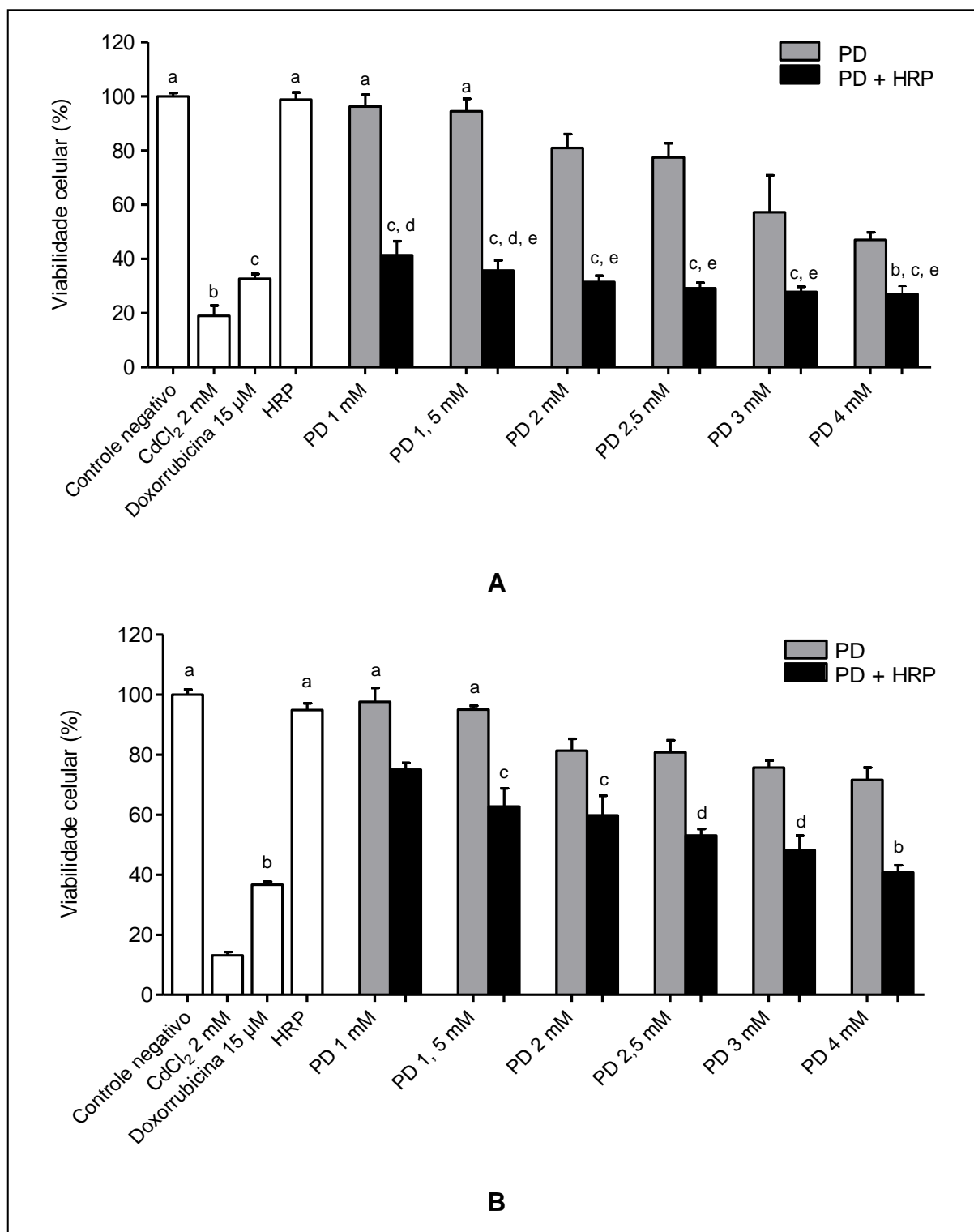


FIGURA 35: Avaliação da citotoxicidade em células MDA-MB-231 mediada pela oxidação da PD pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através das metodologias do MTT (A) e VN (B). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). Letras iguais representam situações que não apresentam diferença estatisticamente significativa. Comparou-se o controle negativo de morte celular com os demais meios reacionais; os controles positivos, CdCl₂ e a Doxorrubicina, com os demais meios reacionais; o meio reacional contendo somente a HRP com os demais; o meio reacional contendo somente o substrato PD com o que contém o sistema PD/HRP completo para cada concentração do substrato; os meios reacionais contendo o sistema PD/HRP nas diferentes concentrações do substrato, $p < 0,05$.

Comparando-se as três metodologias utilizadas para a avaliação da citotoxicidade mediada pelos sistemas IAA/HRP/O₂ e PD/HRP/O₂ é possível observar que para as linhagens MDA-MB-231 e L929 o ensaio do MTT revelou toxicidade, após a exposição aos sistemas, superior à revelada pelo VN para todos os meios contendo o sistema enzima-substrato completo (Figuras 36-A, B e Figura 37-A, B). Por outro lado, após a incubação dos leucócitos com os sistemas, em todas as concentrações dos substratos usadas, o AT mostrou uma redução na viabilidade celular mais expressiva quando comparada às outras metodologias, seguido pelo MTT e por último o VN (Figura 36-C e Figura 37-C).

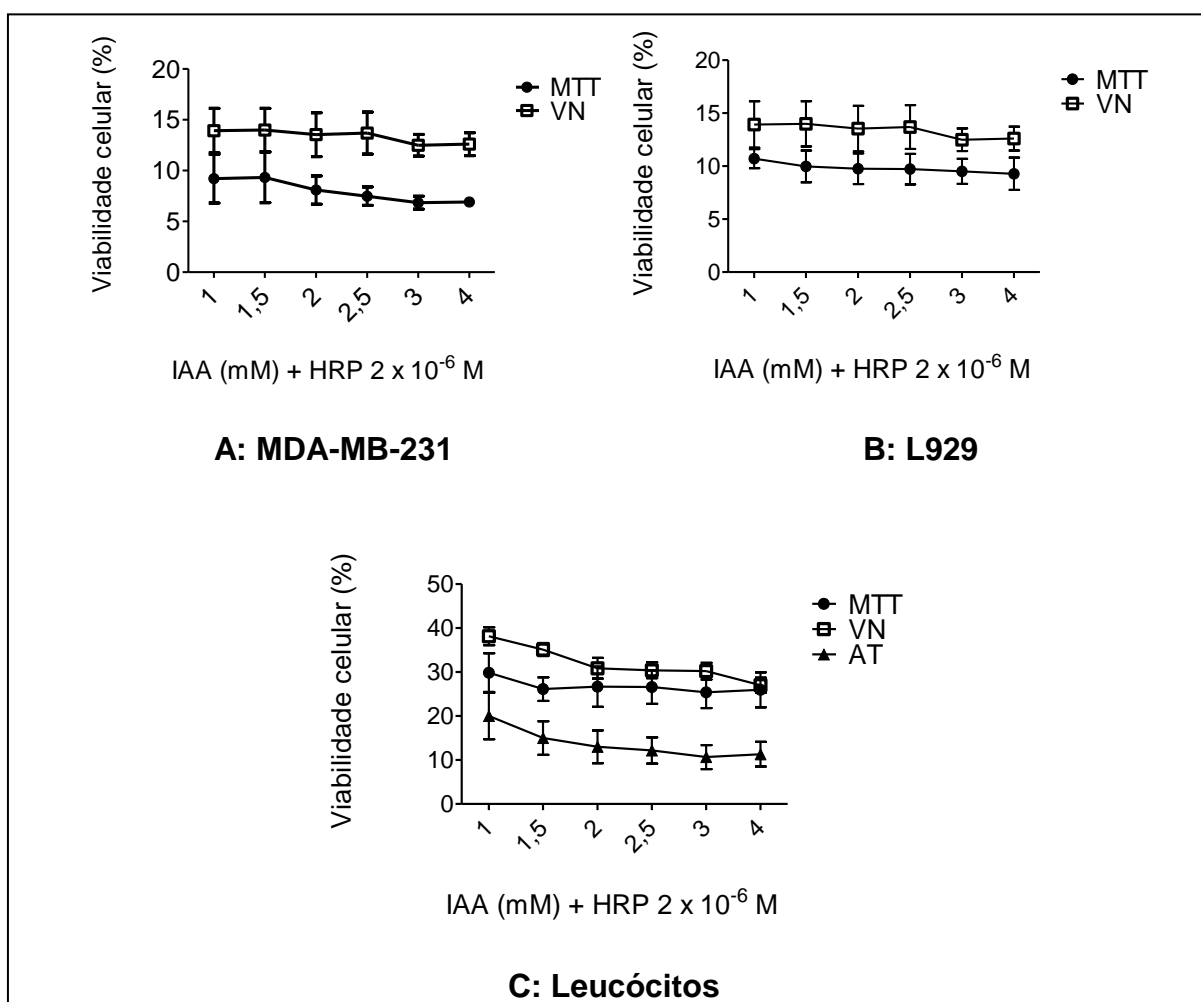


FIGURA 36: Comparação entre os ensaios MTT, VN e AT para a determinação da citotoxicidade mediada pela oxidação do IAA pela HRP. Em A: células MDA-MB-231. As curvas (●) e (□) apresentaram-se estatisticamente diferentes em todas as concentrações do IAA; B: Células L929. As curvas (●) e (□) apresentaram-se estatisticamente diferentes em todas as concentrações do IAA; C: Leucócitos. As curvas (●) e (▲); (□) e (▲) apresentaram-se estatisticamente diferentes em todas as concentrações do IAA; as curvas (●) e (□) não apresentaram diferença estatisticamente significativa na concentração de 4 mM. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes (n=4) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento), $p < 0,05$.

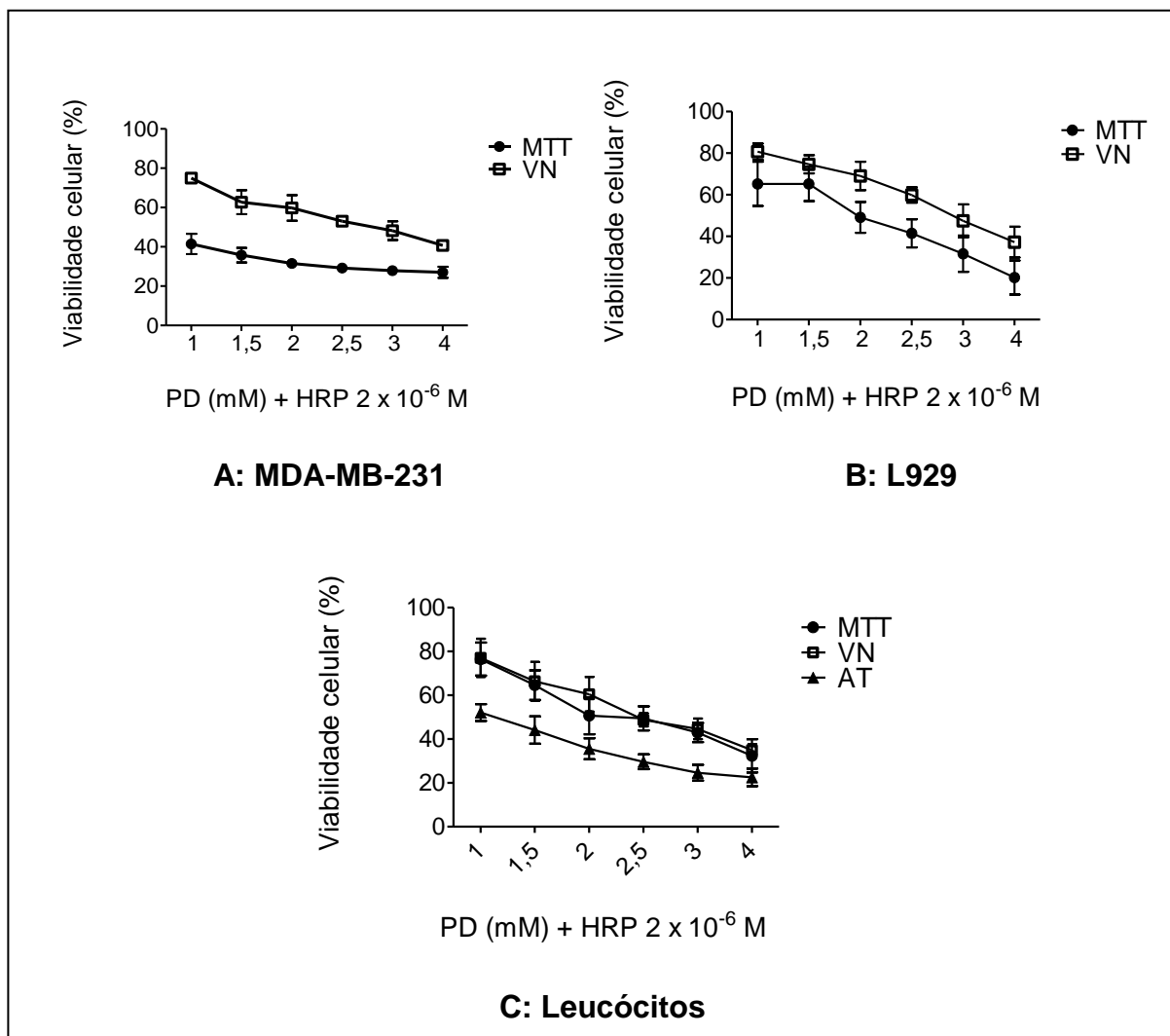


FIGURA 37: Comparação entre os ensaios MTT, VN e AT para a determinação da citotoxicidade mediada pela oxidação da PD pela HRP. Em A: células MDA-MB-231. As curvas (●) e (□) apresentaram-se estatisticamente diferentes em todas as concentrações da PD; B: Células L929. As curvas (●) e (□) apresentaram-se estatisticamente diferentes em todas as concentrações da PD; C: Leucóцитos. As curvas (●) e (▲); (□) e (▲) apresentaram-se estatisticamente diferentes em todas as concentrações da PD; as curvas (●) e (□) não apresentaram diferença estatisticamente significativa nas concentrações de 1; 1,5; 2,5; 3 e 4 mM. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento), $p < 0,05$.

5.4 Análise microscópica das alterações morfológicas induzidas pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O

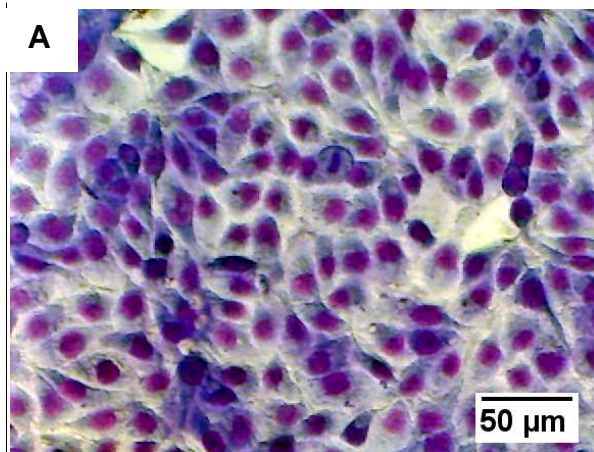
A avaliação das alterações morfológicas induzidas pelos produtos provenientes da oxidação dos substratos PD e IAA pela HRP em células MDA-MB-231 pela análise microscópica de lâminas coradas pelo método de May-Grunwald e

Giemsa forneceu resultados que confirmaram a citotoxicidade mediada pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂.

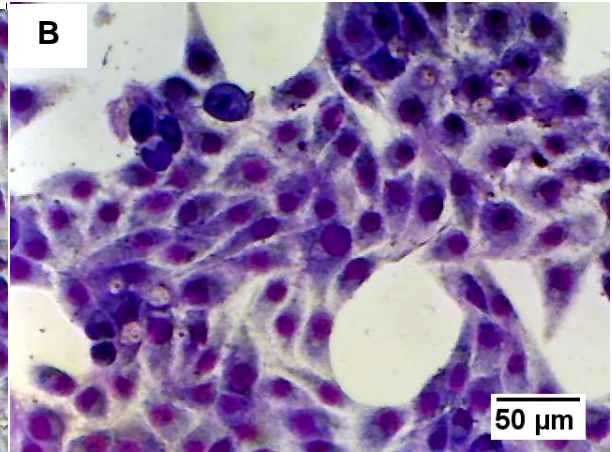
Como observado na Figura 38, os produtos provenientes da oxidação do IAA pela HRP induziram significativas alterações morfológicas nas células tumorais quando comparado às células incubadas somente na presença do meio de cultura, as quais se apresentaram íntegras, com núcleo e citoplasma bem definidos (Figura 38-A). As células do controle negativo estavam em contato umas com as outras (Figura 38-A), já na presença do sistema IAA/HRP/O₂ se destacaram das células vizinhas (Figura 38-E a J). Além disso, notou-se uma intensa destruição celular e redução no número total de células que apresentaram uma retração celular (Tabela 2). Observou-se a presença de estruturas semelhantes a vacúolos no citoplasma das células (Figura 38-F) e fragmentação citoplasmática (Figura 38- E a J), o que também parece ocorrer com o núcleo celular que adquire um aspecto mais denso (Figura 38-F, H, I e J). Essas alterações se tornaram mais evidentes com o aumento da concentração do substrato IAA e se assemelharam às induzidas pelo CdCl₂ (Figura 38-K), uma substância pró-apoptótica.

Contudo, apesar da eficiência do sistema IAA/HRP/O₂ observou-se que o próprio substrato IAA apresentou considerável toxicidade mesmo na ausência da HRP, nas três concentrações testadas. Sendo assim, também foi possível evidenciar uma significativa retração celular, acompanhada de alterações dos contornos celulares e perda das junções entre as células (Tabela 2 e Figura 38- B, C e D), modificações essas, que se tornaram mais evidentes na concentração de 4 mM. A HRP, no entanto, não se mostrou tóxica, dessa forma, as células quando tratadas somente com essa enzima não apresentaram alterações morfológicas expressivas (Tabela 2 e Figura 38- L), o que confirmou a baixa toxicidade da enzima evidenciada nos ensaios de avaliação da viabilidade celular.

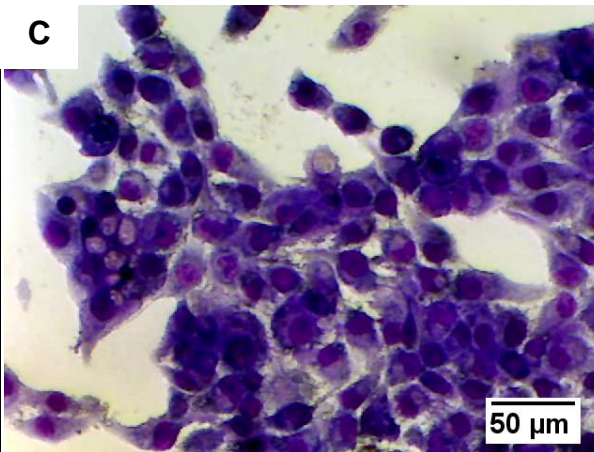
A doxorubicina (DXR) (Figura 38-L) e o CdCl₂ (Figura 38-K) foram usados como controle positivo por se tratarem de substâncias conhecidamente indutoras de apoptose. Contudo, algumas mudanças morfológicas que permitem a elucidação do processo de morte celular e a diferenciação entre necrose e apoptose podem não ser vistas por microscopia óptica, requerendo outras técnicas como a microscopia eletrônica.



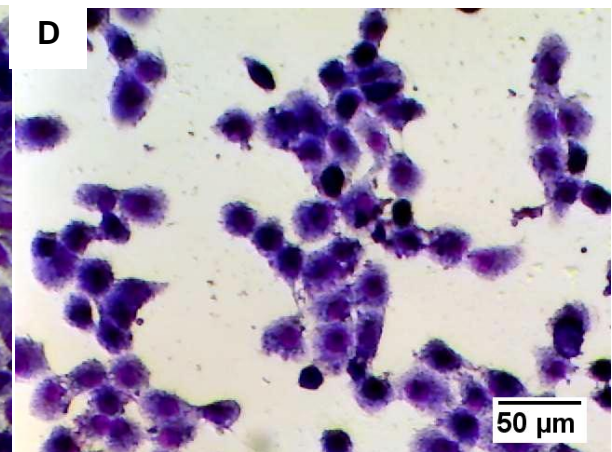
Controle negativo



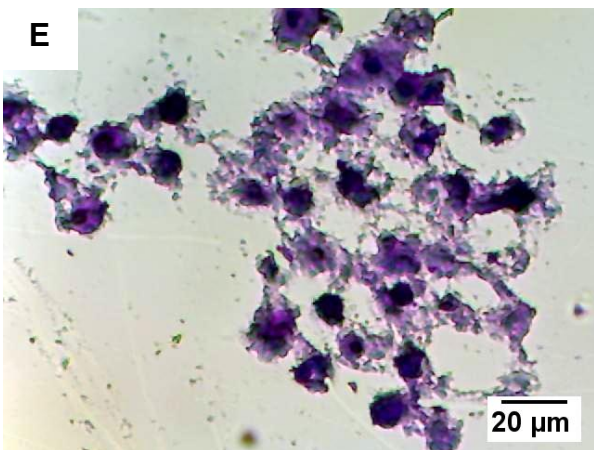
IAA 1 mM



IAA 2 mM



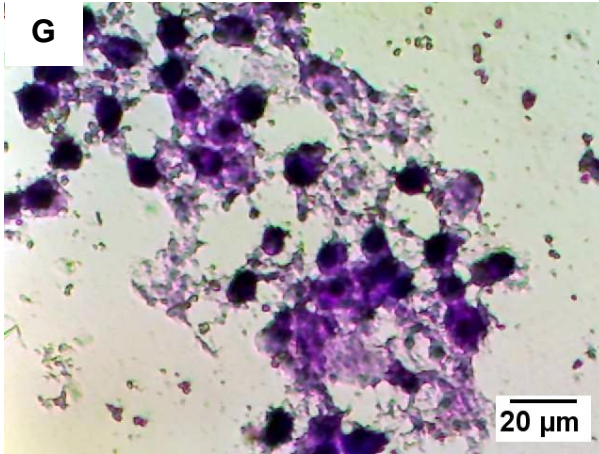
IAA 4 mM



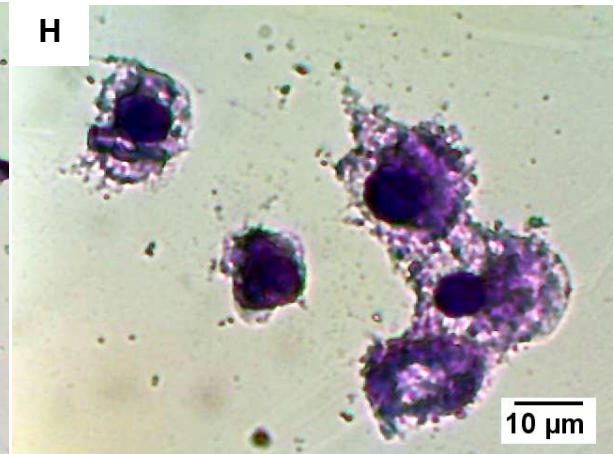
IAA 1 mM + HRP



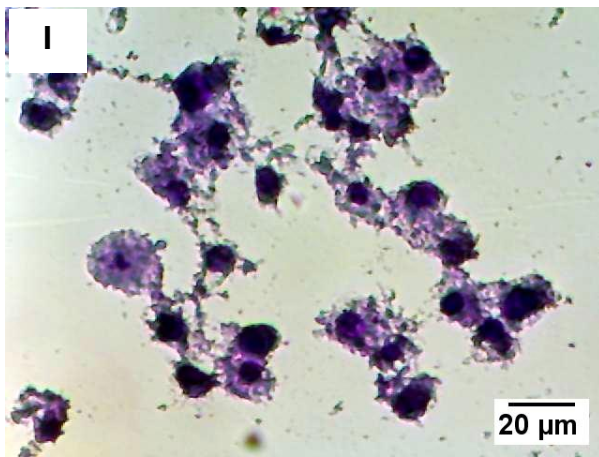
IAA 1 Mm + HRP



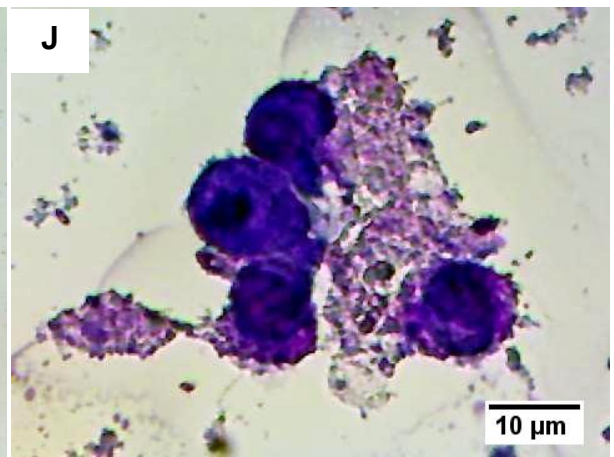
IAA 2 mM + HRP



IAA 2 mM + HRP



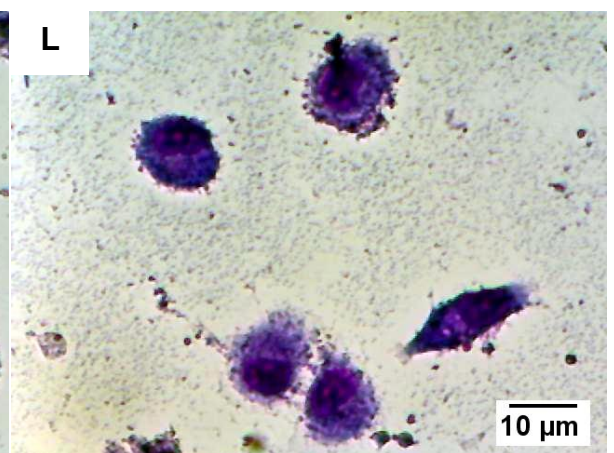
IAA 4 mM + HRP



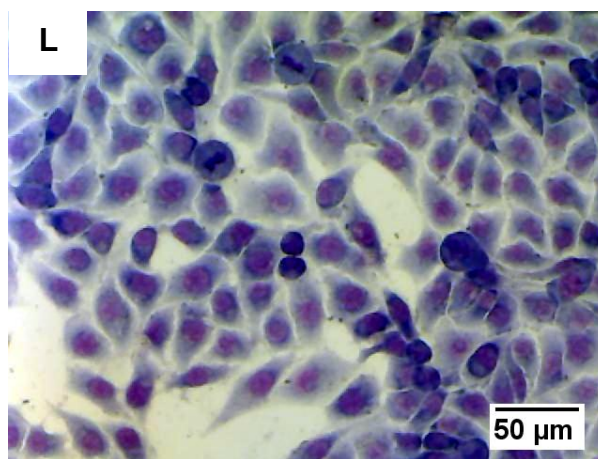
IAA 4 mM + HRP



CdCl_2 2 mM



DXR 15 μg/mL

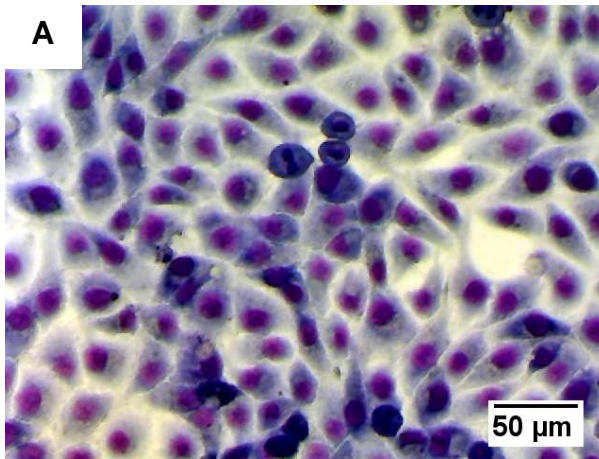


HRP 2×10^{-6} M

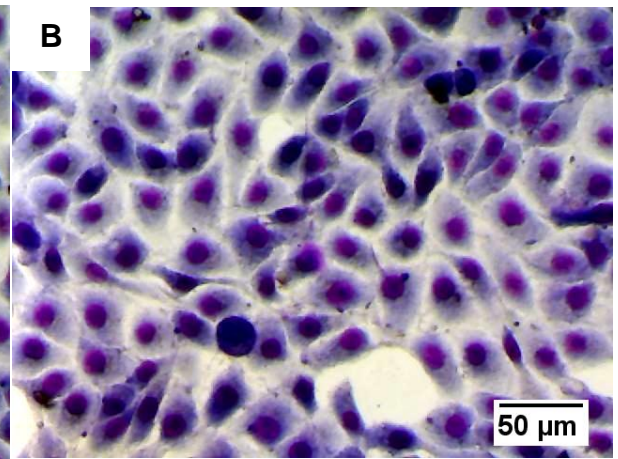
FIGURA 38: Avaliação das alterações morfológicas em células MDA-MB-231 induzidas pela oxidação do IAA pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através da coloração de May-Grunwald e Giemsa. Fotos representativas de experimentos realizados em triplicata

O sistema PD/HRP/O₂ também promoveu alterações morfológicas expressivas observadas na Figura 39- D a I. Houve retração celular (Tabela 2) acompanhada do aparecimento de estruturas semelhantes a vacúolos no interior do citoplasma (Figura 39-I), o qual se tornou mais denso e corado (Figura 39-G, H e I). Observaram-se alterações no contorno celular e perturbações das junções celulares que justificam a separação entre as células vizinhas. Alterações nucleares também foram evidenciadas, assim, o núcleo tornou-se mais denso e levemente deslocado para a periferia.

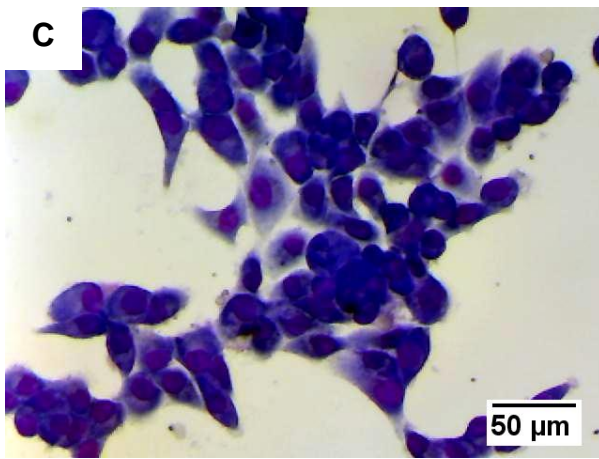
O uso isolado da PD nas concentrações de 1 mM e 2 mM (Figura 39- A e B) não pareceu induzir alterações morfológicas significativas em relação ao controle negativo (Figura 38- A) o que confirma a baixa citotoxicidade desse substrato, evidenciada através das metodologias de avaliação da viabilidade celular. No entanto, o substrato na concentração de 4 mM (Tabela 2 e Figura 39- C) induziu algumas alterações dentre elas a retração celular e a diminuição do contato entre as células vizinhas.



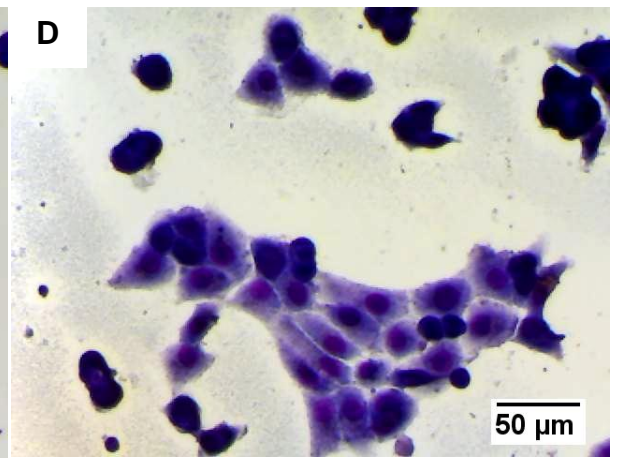
PD 1 mM



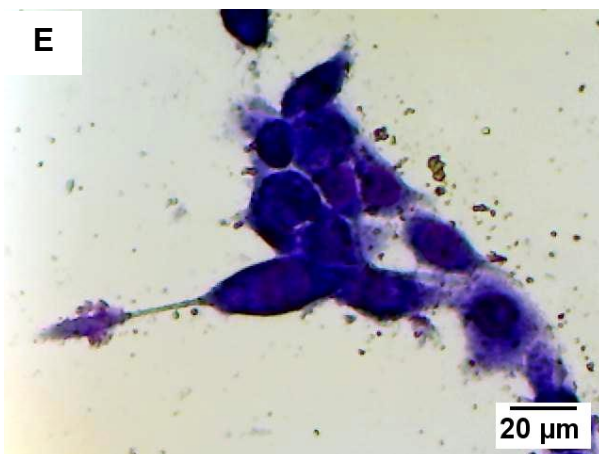
PD 2 mM



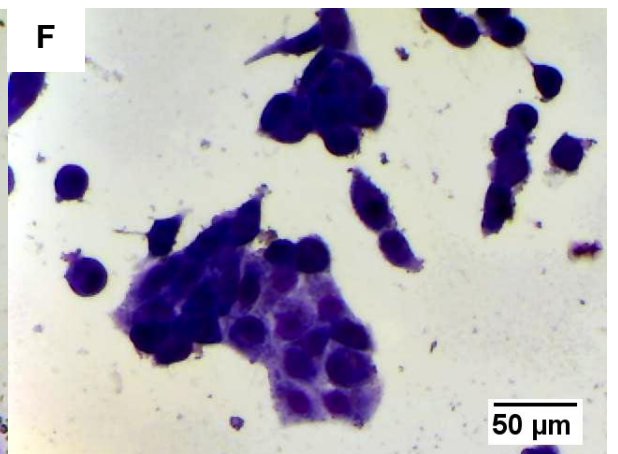
PD 4 mM



PD 1 mM + HRP



PD 1 mM + HRP



PD 2 mM + HRP

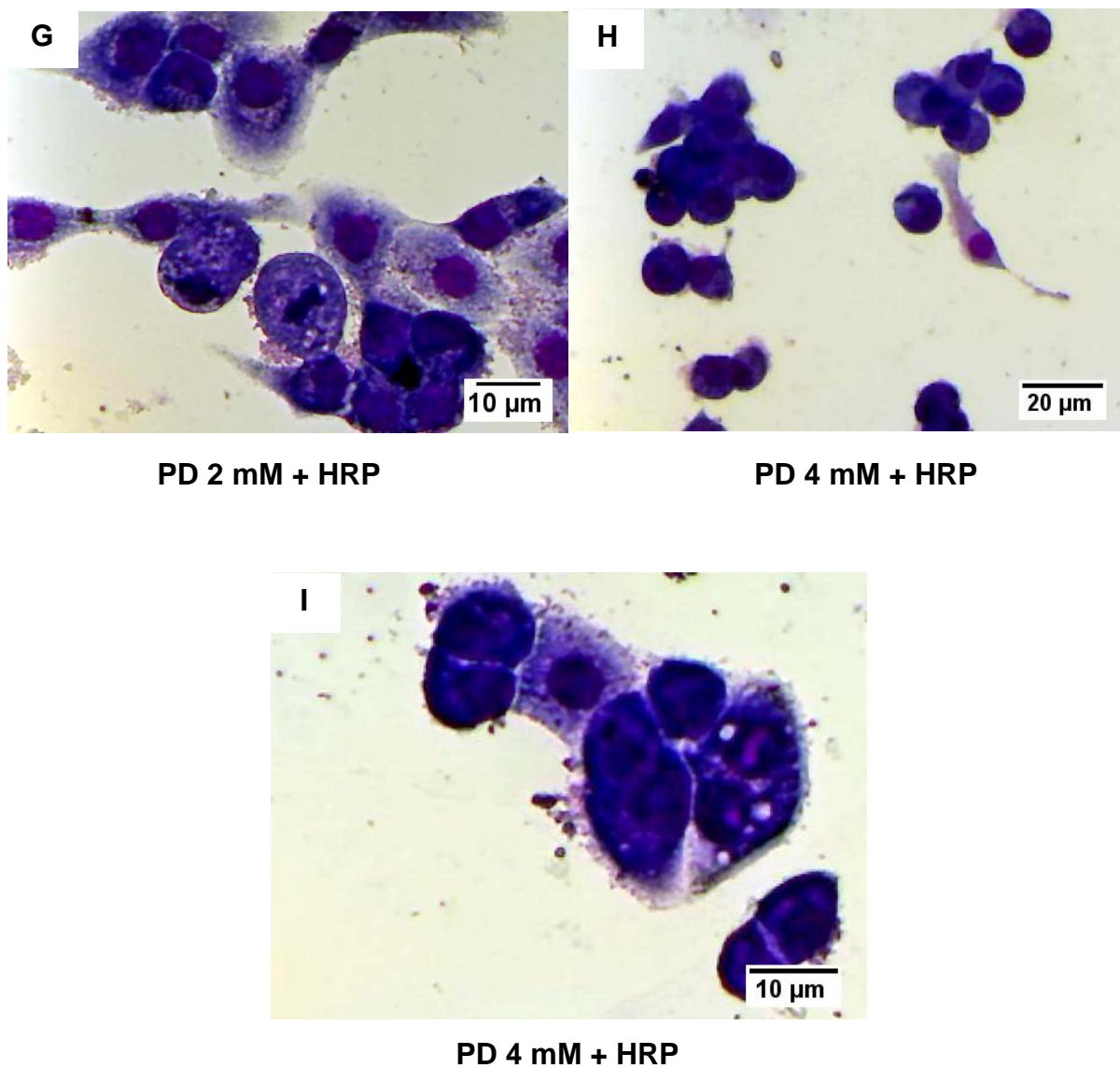


FIGURA 39: Avaliação das alterações morfológicas em células MDA-MB-231 induzidas pela oxidação da PD pela HRP (2×10^{-6} M) na ausência de peróxido através da coloração de May-Grunwald e Giemsa, Fotos representativas de experimentos realizados em triplicata.

TABELA 2: Dimensões celulares da linhagem MDA-MB-231 determinadas após 24 horas de tratamento com os sistemas IAA/HRP/O₂ e PD/HRP/O₂

Tratamento	Dimensões celulares (média ± dp; µm)	
	Comprimento	Largura
Controle negativo	66,82 ± 4,83	33,53 ± 3,46
IAA 1 mM	53,06 ± 3,2	20,42 ± 2,64
IAA 2 mM	33,62 ± 4,35	17,72 ± 2,84
IAA 4 mM	25,86 ± 4,16	22,43 ± 2,30
IAA 1 mM + HRP	18,92 ± 2,34	12,17 ± 2,30
IAA 2 mM + HRP	14,76 ± 2,62	11,68 ± 2,03
IAA 4 mM + HRP	16,13 ± 3,19	10,80 ± 2,13
PD 1 mM	62,52 ± 5,75	27,45 ± 2,56
PD 2 mM	52,31 ± 4,9	29,78 ± 4,08
PD 4 mM	34,45 ± 8,47	22,44 ± 3,95
PD 1 mM + HRP	27,22 ± 9,98	17,96 ± 4,58
PD 2 mM + HRP	22,97 ± 5,01	14,36 ± 4,70
PD 4 mM + HRP	12,34 ± 2,92	10,38 ± 1,82
HRP	56,23 ± 5,43	26,85 ± 3,49
CdCl ₂ 2 mM	15,00 ± 2,22	11,33 ± 1,87
DXR 15 µg/mL	15,29 ± 4,04	10,54 ± 2,75

Obs: Os experimentos foram realizados em triplicata e as dimensões celulares calculadas utilizando o software ImageJ.

5.5 Ensaio de apoptose por citometria de fluxo

Uma vez que o tratamento das linhagens celulares com os sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂ induziu morte celular, foi realizado um ensaio para avaliar a exposição da fosfatidilserina e, conseqüentemente investigar se essas alterações celulares estavam associadas à ocorrência de apoptose ou necrose. As células MDA-MB-231 foram tratadas com os dois sistemas, separadamente, e avaliadas após 24 horas. As células não tratadas (controle negativo) concentraram-se no quadrante inferior esquerdo (Q3= 99,73% ± 0,46) nos gráficos de pontos (*dot plot*), o que indica que essas populações não foram significativamente marcadas por anexina V-FICT nem por PI (Figura 40). Nos grupos tratados com o sistema IAA/HRP/O₂ observou-se, para todas as concentrações do IAA testadas, um deslocamento da população para o quadrante superior direito (Q2_{IAA 1 mM + HRP}= 99,80% ± 0,17; Q2_{IAA 2 mM + HRP}= 99,30% ± 1,03; Q2_{IAA 4 mM + HRP}= 99,70% ± 0,51) (Figura 40 e Figura 41-A), indicando que as células foram marcadas pela anexina V-FICT e PI (anexina V+ PI+) e, portanto, encontram-se provavelmente em estágios tardios da apoptose, o que também foi observado quando as células foram incubadas na presença do CdCl₂ (Q2= 96,8 ± 1,95), utilizado como controle positivo de morte celular (Figura 40).

As células incubadas na presença do sistema PD/HRP/O₂, ao contrário do observado para as metodologias do azul de Trypan, MTT e vermelho neutro, apresentaram uma distribuição no gráfico de pontos (*dot plot*) muito semelhante à observada para o controle negativo. As células tratadas com esse sistema concentraram-se no quadrante inferior esquerdo e foram pouco marcadas pela anexina V-FICT e por PI (Q3_{PD 1 mM + HRP}= 97,96% ± 1,0; Q3_{PD 2 mM + HRP}= 98,03% ± 1,53; Q3_{PD 4 mM + HRP}= 97,99% ± 1,29) (Figura 40). Houve um pequeno deslocamento das células para os quadrantes inferior e superior direito indicando um aumento da marcação pela anexina V-FITC e PI que, no entanto, não foi significativamente diferente do controle negativo (Figura 41- B). A análise dos dados e a determinação da porcentagem de células presentes em cada quadrante dos gráficos foi realizada no *software* FACSDiva.

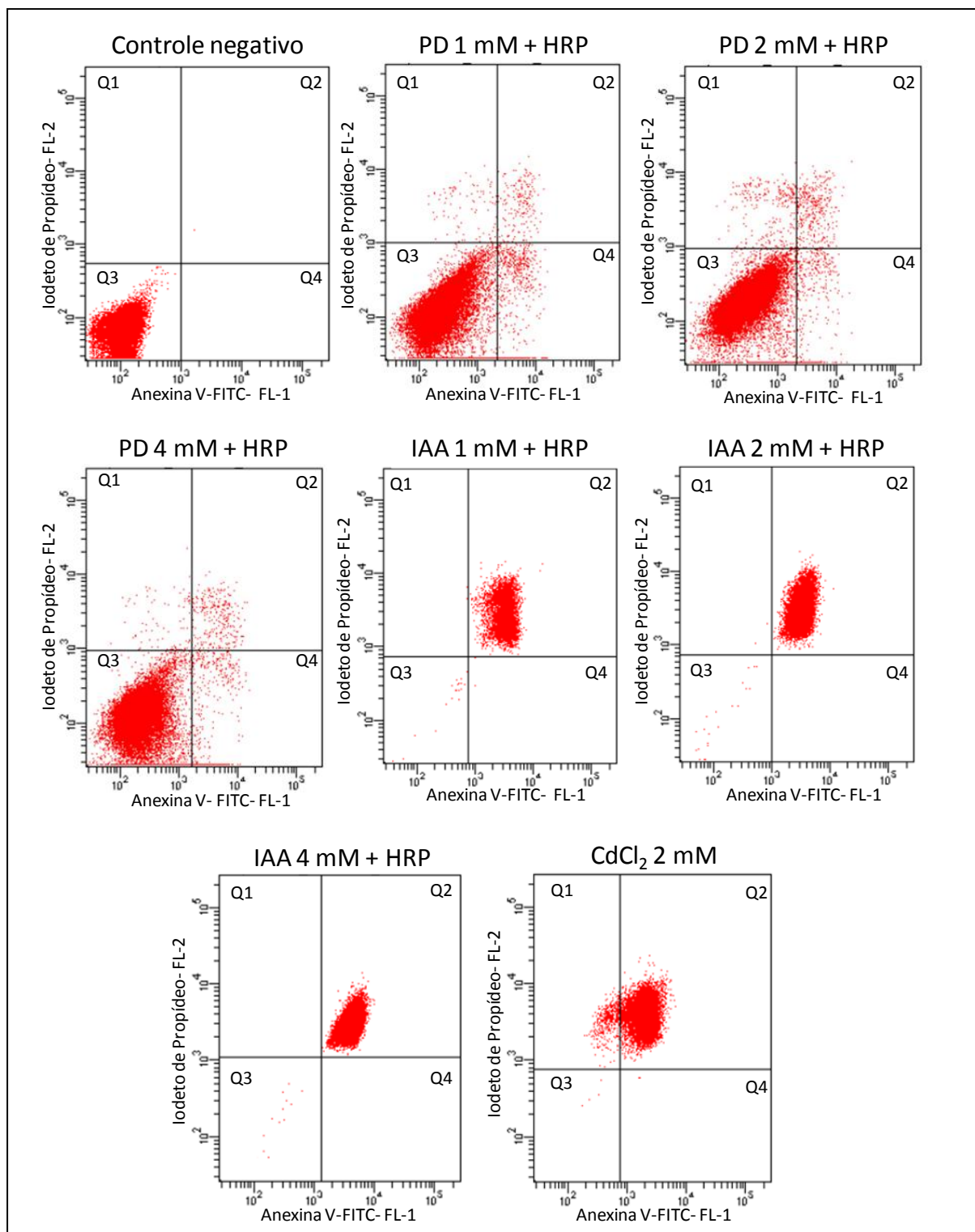


FIGURA 40: Avaliação da morte celular da linhagem MDA-MB-231 induzida pela oxidação do IAA e da PD pela HRP (2×10^{-6} M). Gráfico de distribuição pontual (*dot plot*) representativos de células coradas com anexina V-FITC e PI. Os quadrantes representam: Q1- células mortas por necrose (AV+, IP+); Q2- células em estágio de apoptose tardia (AV+, IP+); Q3- células viáveis (AV-, IP-); Q4- células em estágio inicial de apoptose (AV+, IP-). O controle negativo foi constituído por células não tratadas e como controle positivo foi utilizados o CdCl_2 (2 mM).

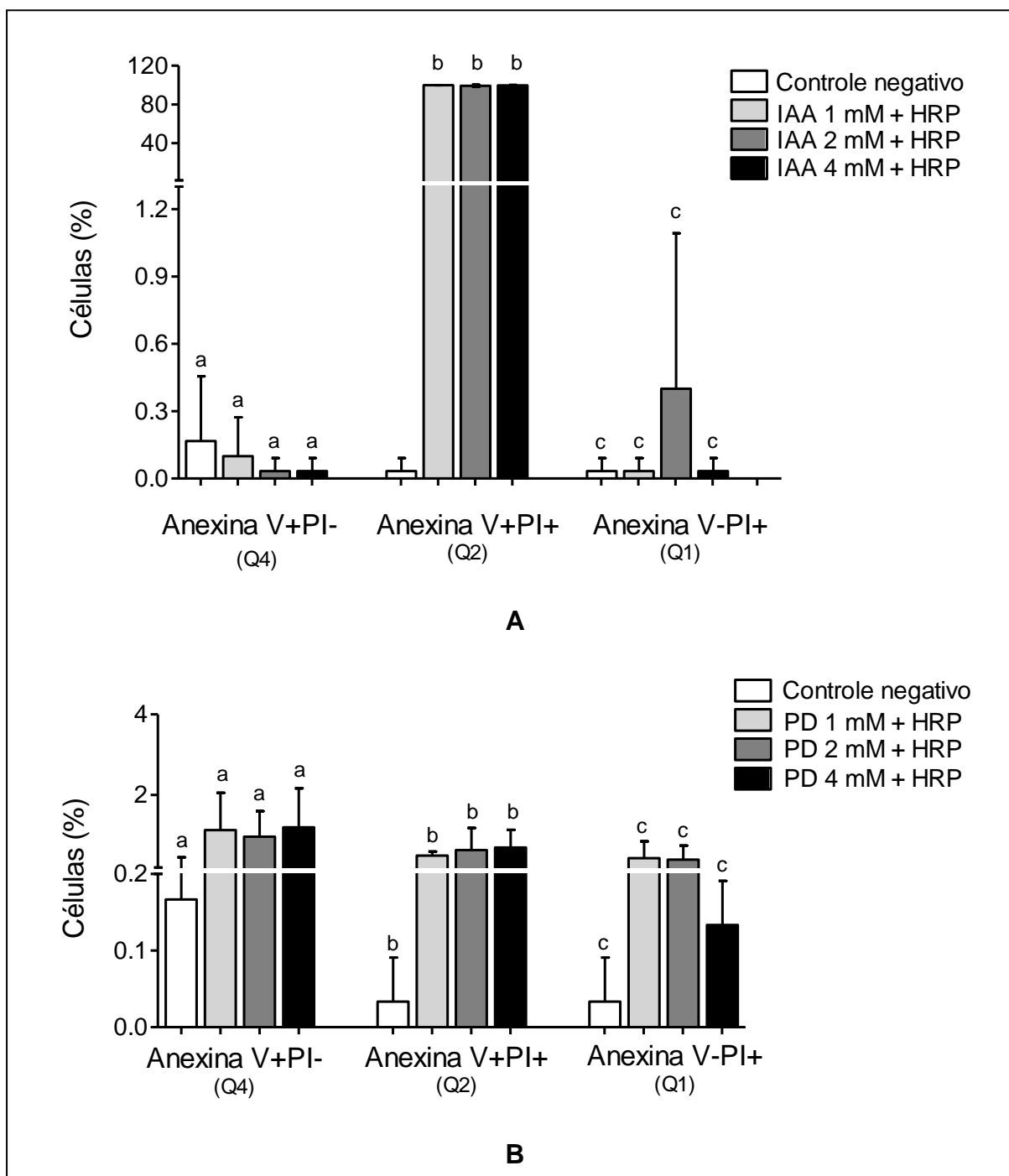


FIGURA 41: Avaliação da morte celular da linhagem MDA-MB-231 induzida pela oxidação do IAA e da PD pela HRP (2×10^{-6} M) através da marcação com Anexina V-FITC (AV) e iodeto de propídeo (PI) por citometria de fluxo. Em A: porcentagem de células da linhagem MDA-MB-231, de um total de 20.000 eventos, distribuídas nos quadrantes Q4, Q2 e Q1 após a exposição ao sistema IAA/HRP/O₂. Em B: porcentagem de células da linhagem MDA-MB-231, de um total de 20.000 eventos, distribuídas nos quadrantes Q4, Q2 e Q1 após a exposição ao sistema PD/HRP/O₂. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Letras iguais representam situações que não apresentam diferença estatisticamente significativa. Comparou-se, em cada grupo (Anexina+PI-; Anexina+PI+; Anexina-PI+), o controle negativo com os demais meios reacionais e os meios contendo o sistema enzima-substrato com diferentes concentrações do substrato, $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

A terapia ADEPT consiste em uma estratégia que visa proporcionar um aumento na eficácia da terapia citotóxica e envolve o emprego de anticorpos, específicos para moléculas expressas em células tumorais, conjugados a enzimas que têm como substrato um pró-fármaco que é cataliticamente ativado somente nas proximidades das células tumorais e se difunde a partir do local onde é gerado, vindo a matar outras células tumorais nas proximidades (DENNY, 2001; ZAWILSKA; WOJCIESZAK; OLEJNICZAK, 2013).

Inúmeras combinações de enzimas e pró-fármacos para aplicação na terapia ADEPT estão em fase de desenvolvimento e pesquisa clínica. Dentre essas, o sistema IAA/HRP/O₂ tem ganhado destaque e o seu emprego na terapia ADEPT tem sido muito estudado. Sabe-se que a oxidação do IAA pela HRP leva à produção de espécies reativas dentre elas os radicais indolil, peroxil e ERO (KIM et al., 2006) conhecidas por mediar reações deletérias, como a lipoperoxidação, e induzir a toxicidade frente a diferentes linhagens celulares tumorais (FOLKES; WARDMAN, 2001; GRECO et al., 2001; LIMA; ABDALLA, 2001; WARDMAN, 2002; DE MELO et al., 2004; DALMAZZO et al., 2011). Recentemente, levando em consideração a capacidade da PD, um composto β -dicarbonílico, de ser oxidada pela HRP através de um mecanismo independente de peróxido e cuja cinética se assemelha à oxidação do IAA pela mesma enzima, o sistema PD/HRP/O₂ tem sido estudado para aplicação terapêutica na estratégia ADEPT como uma alternativa ao IAA (RODRIGUES et al., 2006).

No presente estudo, assim como evidenciado por Kim et al. (2006), foi verificado que a combinação IAA/HRP/O₂ leva a produção de ERO que oxidam a 2,7-diclorofluoresceína (DCFH) ao composto fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF), promovendo o aumento na absorbância do meio de reação que contém a enzima e o seu substrato, respectivamente a HRP e o IAA, quando comparado ao meio de reação no qual está presente somente o substrato IAA (Figura 15).

A produção de ERO mediada pelo sistema PD/HRP/O₂, também foi observada, porém, foi menos expressiva quando comparada ao sistema IAA/HRP/O₂ (Tabela 1). O uso de uma concentração maior do substrato (3 mM) não promoveu um aumento significativo na produção de ERO. A maior variação de absorbância

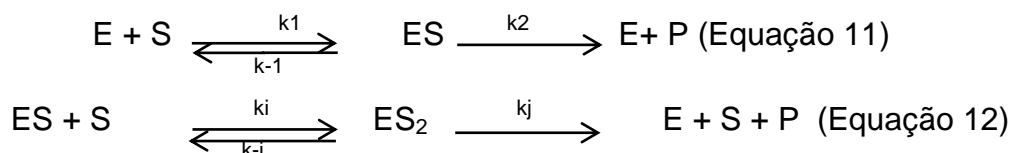
entre as reações com e sem a adição da HRP foi detectada para a concentração de 1 mM durante todo o tempo em que as reações foram monitoradas o que indica que para o maior rendimento da reação a melhor concentração da PD é a de 1 mM (Figura 17). O mesmo fenômeno não foi observado para o substrato IAA. O aumento na concentração desse substrato propiciou um consequente aumento na produção de ERO.

Esse comportamento observado na catálise da PD pela HRP pode ser atribuído às características da atividade enzimática. Burtis (2008) relatou que a velocidade da reação enzimática depende tanto da concentração do substrato quanto da enzima. Ao utilizar-se uma concentração mais elevada da PD mantendo constante a concentração da enzima, não foi observado aumento na atividade enzimática, nem uma formação mais expressiva de ERO, o que pode estar relacionado à inibição reversível da enzima pelo excesso do substrato. Em uma reação enzimática convencional, variando-se a concentração do substrato observa-se um aumento na velocidade de formação do produto até que se atinja um valor máximo, relação essa que constitui a curva hiperbólica de Michaelis-Menten (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008). Entretanto, de acordo com Reed (2010) muitas enzimas são inibidas pelo excesso de seus substratos originando curvas de velocidade que atingem um valor máximo e, posteriormente, decrescem com o aumento da concentração do substrato.

Estima-se que 20% das enzimas apresentam essa particularidade que durante anos foi negligenciada, por ser considerada uma característica não fisiológica ou uma anormalidade proveniente do uso de uma concentração artificialmente alta do substrato em análises de laboratórios (KÜHL, 1994; REED; LIEB; NIJHOUT, 2010). Atualmente sabe-se que esse fenômeno medeia importantes processos fisiológicos. A tirosina hidroxilase, que catalisa a primeira etapa de produção da dopamina é inibida reversivelmente pela tirosina, seu substrato. A inibição da acetilcolinesterase pela acetilcolina (ACH) foi descoberta em 1969 e representa a importante função de impedir a degradação precoce da ACH antes que essa atinja a membrana pós-sináptica; a inibição da fosfofrutoquinase por ATP assegura a diminuição na sua produção quando ele é abundante (REED; LIEB; NIJHOUT, 2010).

Existem vários mecanismos destinados a explicar essa alteração na curva de Michaelis-Menten. Segundo Kaiser (1980) um deles envolve a ligação de mais de

uma molécula do substrato à mesma enzima, a qual pode vir a apresentar dois sítios de ligação para o substrato, sendo um catalítico e, portanto, capaz de gerar um produto, e um não-catalítico (Equações 11 e 12).



Onde as letras E, S, P, ES, ES₂ correspondem respectivamente à enzima, substrato, produto, complexo enzima-substrato e complexo enzima-substratos e k₁, k₂, k_i, k_j, k₋₁, k_{-i} e às constantes de equilíbrio das reações (KAISER, 1980; REED; LIEB; NIJHOUT, 2010). Assim, as moléculas de enzima que interagem com mais de uma molécula do substrato originam um complexo que não leva a formação do produto esperado, levando a redução na velocidade da reação. No entanto, não é possível afirmar que seja esse o mecanismo de inibição observado entre a enzima HRP e o seu substrato PD.

Segundo Rota et al. (1999) e Myhre et al. (2003) a DCFH pode ser oxidada pela própria HRP na presença de H₂O₂. Porém, como as reações de oxidação de ambos os substratos são processadas sem ser adicionado ao meio H₂O₂, acredita-se que a oxidação da DCFH à DCF é totalmente atribuída as ERO formadas durante a reação que podem atuar de forma direta oxidando a DCFH ou indireta ao promoverem a oxidação da HRP nativa à forma de HRP composto I que por sua vez desencadeia o processo de oxidação da DCFH.

A adição dos “scavengers” de ERO SOD, CAT ou FS ao meio reacional contendo a enzima HRP e a PD permitiu determinar que as prováveis ERO formadas pela oxidação desse substrato são o radical ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio. Essa afirmação se fundamenta no fato de que a adição de SOD e CAT ao meio promoveu uma diminuição significativa na detecção de espécies reativas de oxigênio quando o substrato foi utilizado na concentração de 1 mM. Esses resultados corroboram com os obtidos por Rodrigues et al. (2006) que utilizando a técnica de quimiluminescência dependente de luminol evidenciaram a supressão da emissão de luz mediante a adição de CAT ou SOD ao meio, dando indícios da formação das H₂O₂ e de O₂^{•-} na reação PD/HRP/O₂.

A avaliação do efeito dos varredores CAT, SOD e FS sobre a oxidação da DCFH pelo sistema IAA/HRP/O₂ foi realizada por Kim et al. (2006) e permitiu detectar a formação de H₂O₂ durante a reação de oxidação do IAA utilizado na concentração de 500 µM pela HRP 3 x 10⁻⁸ M, concentrações essas inferiores às utilizadas nos experimentos realizados no presente trabalho.

Assim como evidenciado por KIM et al. (2006), nesse estudo detectou-se a formação de H₂O₂ mediada pelo sistema IAA/HRP/O₂, no entanto, o efeito “scavenger” da CAT foi visto de forma tardia na reação de oxidação do IAA pela HRP. Isso pode estar associado ao fato de ter sido utilizada uma elevada concentração da enzima e do substrato, levando a uma formação muito expressiva de peróxido de hidrogênio, tornando-o incapaz de ser varrido pelas concentrações da CAT usadas no estudo, que apresentaram-se insuficientes para desempenhar sua ação neutralizadora.

A citotoxicidade mediada pela oxidação do IAA pela HRP encontra-se bem documentada, tendo sido detectada em diferentes linhagens tumorais como células de câncer de mama MCF-7, câncer de cólon HT29, melanoma humano G361, células NB4, células derivadas de leucemia promielocítica aguda (LPA), células provenientes de câncer de pâncreas (BXPC-3) e de câncer de cabeça e pescoço (FOLKES; WARDMAN, 2001; KIM; JEON; PARK, 2004; TUPPER et al., 2004; HUANG et al., 2005; DALMAZZO et al., 2011) assim como sobre microorganismos como *Prototheca zopffii* e *Staphylococcus aureus* (CUNHA et al., 2010; PUGINE, et al., 2010).

O sistema PD/HRP/O₂ e a citotoxicidade mediada por seus produtos, ao contrário do observado para a oxidação do IAA pela HRP, não se encontra tão bem elucidado. Estudos preliminares realizados por Rodrigues et al. (2006) utilizando a metodologia do azul de Trypan e microscopia óptica com coloração de May-Grunwald e Giemsa relataram a indução de morte celular em leucócitos. Contudo, não há estudos destinados a avaliar a sua ação sobre células tumorais, o que se buscou investigar nesse trabalho, assim como a aplicação de outras metodologias para a avaliação da citotoxicidade.

Dessa forma, empregou-se nos estudos de viabilidade celular a linhagem tumoral MDA-MB-231, que assim como outras linhagens de câncer de mama é de fácil manutenção, o que associado ao fato de permitir manipulações genéticas, a torna um modelo relevante e justifica o grande arsenal de informações publicadas e

disponíveis para consulta relativas aos genes e vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento, proliferação e morte dessas células tumorais. Contudo, uma única linhagem pode não ser representativa do comportamento celular e das alterações promovidas por determinada intervenção terapêutica em estudo, o que justifica o emprego de mais de uma linhagem celular para a validação das observações realizadas (BURDALL et al., 2003).

O estudo de viabilidade celular através das metodologias do AT, VN e MTT permitiu comprovar a citotoxicidade mediada pelo sistema PD/HRP/O₂ sobre a linhagem de células tumorais MDA-MB-231, assim como sobre as células não tumorais testadas, sendo elas a linhagem de fibroblastos L929 e leucócitos humanos. As alterações morfológicas apresentadas pelas células MDA-MB-231 quando cultivadas na presença desse sistema (Figura 39) confirmaram o caráter citotóxico dos produtos provenientes da oxidação da PD pela HRP, e permitiram evidenciar a maneira dose dependente com que essa toxicidade se manifesta. Esses resultados foram coerentes com o estudo de citotoxicidade preliminar realizado por Rodrigues et al. (2006).

No entanto, apesar do aumento da concentração do substrato implicar em elevação da citotoxicidade mediada pelo sistema PD/HRP/O₂, observou-se que o substrato a partir da concentração de 2,5 mM tornou-se tóxico, frente a todas as linhagens testadas, mesmo na ausência da HRP. Dessa forma, o uso da PD nas concentrações compreendidas entre 1 e 2 mM apresentou-se mais vantajoso por induzir morte celular significativa somente na presença da HRP, o que, visando a aplicação da PD como pró-fármaco na terapia ADEPT, implicaria em menores efeitos adversos decorrentes da ação citotóxica do próprio substrato.

A citotoxicidade mediada pelo sistema IAA/HRP/O₂ também pôde ser evidenciada pelas metodologias adotadas nesse estudo, sendo, no entanto, até mesmo mais expressiva do que a mediada pelo sistema PD/HRP/O₂ em todas as linhagens celulares estudadas, o que pode estar relacionado à maior formação de ERO pela oxidação do IAA pela HRP quando comparada à oxidação da PD (Tabela 1).

A elevada destruição celular provocada pela oxidação do IAA pela HRP (Figura 38) confirmou a eficiência do sistema relatada em outros trabalhos (FOLKES; WARDMAN, 2001; TUPPER et al., 2004; TUPPER et al., 2010; DALMAZZO et al., 2011). Entretanto, apesar da maioria dos autores, dentre eles KIM et al. (2006),

relatarem a baixa toxicidade *in vitro* do IAA, observou-se nesse estudo uma significativa redução na viabilidade celular na presença isolada desse substrato nas concentrações empregadas, o que segundo Bagshawe et al. (1994) não é viável por implicar na ação indesejável sobre células normais, uma vez que o pró-fármaco é distribuído sistemicamente.

A inespecificidade apresentada pelos produtos provenientes da oxidação dos dois substratos, decorrente da sua ação sobre células não neoplásicas, não inviabiliza o uso da PD e do IAA na terapia antitumoral. Pois na terapia ADEPT a produção das substâncias citotóxicas ocorre nas proximidades do sítio tumoral, mediante a ativação catalítica do substrato por enzimas conjugadas a anticorpos monoclonais dirigidos especificamente contra as células tumorais (BLAU; MENEGON; CHUNG, 2006; SCHELLMAN et al., 2010; MAHATO; TAI; CHENG, 2011).

Nesse estudo foram utilizadas diferentes metodologias para a avaliação da viabilidade celular, o que é justificado pelo fato de que esses ensaios podem fornecer resultados diferentes dependendo da linhagem celular utilizada, assim como do processo de morte celular induzido pela substância em estudo, o que pode superestimar ou subestimar a citotoxicidade (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Assim, no presente trabalho foi possível observar que as três linhagens celulares foram sensíveis aos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂, sendo essa sensibilidade detectada pelas três metodologias. Entretanto, apesar dos ensaios de determinação da viabilidade celular MTT e VN serem considerados comparáveis (BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988), o ensaio do MTT apresentou maior sensibilidade para a detecção da citotoxicidade induzida pelos dois sistemas enzima-substrato em células MDA-MB-231 e L929 (Figuras 36 e 37- A e B). Considerando que o MTT determina a viabilidade celular com base no funcionamento mitocondrial (MOSMANN, 1983), esses resultados indicam que no processo de morte celular induzido pelos sistemas em estudo nessas duas linhagens, o comprometimento respiratório precede os efeitos deletérios sobre os lisossomos e a ruptura da membrana plasmática, os quais são avaliados pelo ensaio do VN (BABICH; BORENFREUND 1991).

A maior sensibilidade apresentada pelo azul de Trypan (AT) para a detecção da toxicidade em leucócitos (Figuras 36 e 37- C) pode indicar que o processo de morte celular induzido pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂ sobre essas células

é diferente do até então observado nas demais linhagens, e envolve uma ruptura precoce da membrana celular. Contudo, a determinação da viabilidade celular pelo AT se trata de um método mais subjetivo e, portanto sujeito a variações inerentes à experiência do analista e a sua capacidade de distinção entre células vivas e mortas, o que pode comprometer a confiabilidade do ensaio. Segundo Altman (1993) a determinação da citotoxicidade através da metodologia do AT está sujeita a superestimação devido à incorporação do corante por células viáveis, que normalmente excluem o AT. Isso ocorre quando a contagem não é efetuada rapidamente e justifica a baixa precisão observada em situações em que há um grande número de amostras (KIM et al., 2011).

Dessa forma, considerando-se essas limitações inerentes à metodologia do AT, acredita-se que possa ter ocorrido uma superestimação da citotoxicidade ao ser utilizada essa técnica. Isso se torna mais evidente quando se considera o fato do VN, que também consiste em um ensaio para a avaliação da permeabilidade da membrana plasmática, não ter detectado a toxicidade induzida pelos sistemas em leucócitos de forma tão sensível quanto o AT (REPETTO; DEL PESO; ZURITTA, 2008).

Assim, pressupõe-se que o processo de morte celular desencadeado pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂ sobre as linhagens celulares empregadas nesse estudo, afeta inicialmente o funcionamento mitocondrial, sendo, portanto, o método MTT mais adequado para esse estudo de viabilidade celular.

Os ensaios para a detecção da produção de ERO e avaliação da citotoxicidade mediada pelos sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂ permitiram evidenciar uma similaridade entre os dois sistemas. A produção de ERO durante a oxidação da PD pela HRP, apesar de menos expressiva, foi eficientemente detectada através da oxidação da DCFH de forma semelhante à reação de oxidação do IAA pela mesma enzima. Os produtos da reação de catálise da PD pela HRP, dentre eles as ERO, induziram uma citotoxicidade significativa sobre a linhagem tumoral de câncer de mama (MDA-MB-231) (Figura 35), representando um importante resultado já que a ação do sistema frente a células tumorais, dotadas de inúmeros mecanismos de evasão à morte celular, ainda não havia sido avaliada.

Uma vez que o tratamento com os sistemas IAA/HRP/O₂ e PD/HRP/O₂ induziram morte celular buscou-se investigar os mecanismos envolvidos. Considerando que a oxidação dos substratos IAA e PD pela HRP levam a produção

de ERO, que, por sua vez, podem ativar as vias da apoptose, foi avaliada a porcentagem de células apoptóticas 24 horas após a exposição aos sistemas enzima-substrato (YARNOLD, 1997).

A apoptose, por representar um processo de morte celular programada e altamente regulada, que promove a eliminação das células não viáveis através de um programa intrínseco de suicídio celular, que não desencadeia uma resposta imunológica e destruição tecidual tão pronunciada quanto a necrose, representa o mecanismo ideal para a eliminação de células tumorais por substâncias anticarcinogênicas (ELMORE, 2007; HAN; KIM; KIM, 2008).

Uma dos marcos iniciais da apoptose, que pode ser pesquisado nos testes laboratoriais para a confirmação da morte celular programada, consiste na exposição da fosfatidilserina (FS), um fosfolípídeo localizado normalmente na porção interna da bicamada lipídica. Durante a apoptose, a aminofosfolípídeo translocase dependente de ATP responsável pela manutenção da FS na porção intracelular da membrana, é oxidada pelo citocromo c, liberado com a alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial, o que associado a ativação da enzima fosfolípídeo *Scramblase*, permite a translocação da FS para a camada externa da bicamada lipídica. Essa alteração na composição da membrana é crucial para o reconhecimento das células em apoptose recente pelos fagócitos e consequente eliminação das mesmas (FADOK et al., 2001; WU; TIBREWAL; BIRGE, 2006).

A detecção da apoptose com base nos níveis de exposição da fosfatidilserina pode ser realizada através do uso da proteína anexina V conjugada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). A anexina V devido a sua propriedade de, na presença de cálcio, se ligar aos fosfolípídeos da membrana plasmática dentre eles a fosfatidilserina, com a qual se liga com mais avidéz devido às cargas negativas da mesma, permite quantificar o número de células em apoptose. A diferenciação entre células em apoptose recente e tardia pode ser realizada através do uso concomitante do iodeto de propídeo (PI), outro marcador celular capaz de interagir com sequências de DNA, mas que somente tem acesso ao espaço intracelular através da perda da integridade da membrana plasmática, processo esse que ocorre mais tardiamente durante a apoptose. Essa diferença na marcação das células possibilita a distinção entre células em apoptose recente (anexina V+PI-), tardia (anexina V+PI+) e necrose (anexina V-PI+) (VERMES et al., 1995; VERMES;

HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000; HINGORANI et al., 2011; RIEGER et al., 2011).

Assim, observou-se que após 24 horas de exposição ao sistema IAA/HRP/O₂ praticamente todas as células MDA-MB-231 apresentavam-se em apoptose tardia tendo sido marcadas pela anexina V-FITC e pelo PI (Figuras 40 e 41) o que associado as alterações morfológicas observadas na análise microscópica (Figura 38), dentre elas a redução do volume celular, vacuolização e fragmentação citoplasmática e nuclear permite inferir que o sistema em questão induz morte celular via apoptose, o que já havia sido exposto na literatura. Kim (2004) evidenciou que a ação catalítica da HRP sobre o IAA gera compostos capazes de induzir a apoptose de células de melanoma humano G361 através da ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases) que atuam como importantes mediadores dos sinais de estresse que levam à apoptose.

Entretanto, os resultados provenientes da avaliação da apoptose mediada pelo sistema PD/HRP/O₂, pareceram contradizer aqueles obtidos no estudo de avaliação da viabilidade celular assim como na avaliação microscópica das alterações morfológicas induzidas por esse sistema, os quais permitiram constatar a ação citotóxica dos produtos da oxidação da PD pela HRP. As células, após a exposição ao sistema durante 24 horas, foram pouco marcadas pela anexina V-FITC e pelo PI (Figuras 40 e 41).

Considerando-se que essa reação envolve a formação de espécies conhecidamente citotóxicas como o H₂O₂ e O₂^{•-}, cuja produção foi evidenciada nesse trabalho, e o metilglioxal (RODRIGUES et al., 2006), um dos mais poderosos agentes glicadores de proteínas e outros componentes celulares (ANTOGNELLI et al., 2013), e ainda partindo do princípio de que elas induzem a morte celular via apoptose, sugere-se que essa ausência de marcação pelos fluoróforos anexina V-FITC e PI pode estar associada a um fenômeno denominado *Quenching*, que consiste na diminuição da intensidade de fluorescência emitida por uma dada substância que apresenta em sua molécula um grupo fluoróforo (HO; PATONAY; WARNER, 1986).

Essa redução na fluorescência pode ser ocasionada por uma variedade de interações moleculares, contudo os processos mais comuns são o *Quenching* dinâmico colisional, o *Quenching* estático e transferência ressonante de energia por fluorescência (FRET) (HO; WARNER, 1986; PETIT; DENIS-GAY; RATINAUD, 1993;

MÁTYUS; SZÖLLŐZI; JENEI, 2006; LAKOWICZ, 2009). A diminuição da fluorescência mediada por colisões ocorre quando um fluoróforo, que se encontra no estado excitado, entra em contato com átomos ou moléculas como o oxigênio molecular ou a acrilamida, capazes de mediar a sua transição para o estado fundamental sem haver, no entanto, a emissão de fótons. No *quenching* estático a redução na intensidade de fluorescência ocorre pela formação de um complexo entre um *quencher*, agente de extinção, não fluorescente e o fluoróforo, o qual por estar no estado fundamental não pode ser excitado (EFTINK; GHIRON, 1981). O FRET é um mecanismo especial de supressão da fluorescência que ocorre quando o fluoróforo, no estado excitado, doa o excesso de energia para um fluoróforo receptor localizado nas imediações, havendo a sobreposição entre o espectro de emissão do doador e o espectro de absorção da molécula receptora, o que impede a emissão de fótons (MÁTYUS; SZÖLLŐZI; JENEI, 2006).

O *Quenching* pode se tornar um problema prático para as análises em citometria de fluxo envolvendo dupla fluorescência. Segundo Van Amersfoort (1994) o corante azul de Trypan em concentrações superiores a 0,1 % em meio ácido promove a redução da fluorescência verde, o que corresponde a uma limitação para a análise do fenótipo de células usando a coloração dupla com anticorpos monoclonais conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), que apresenta fluorescência amarelo esverdeada. A diminuição do sinal emitido por fluorocromos utilizados em citometria de fluxo também foi evidenciada por Chapple (1990) em um estudo com os corantes fluoresceína e R-ficoeritrina (EPR). O uso de concentrações elevadas da EPR proporcionou uma redução significativa no sinal emitido pela fluoresceína em uma análise de dupla fluorescência de linfócitos marcados com anticorpos monoclonais conjugados com esses fluorocromos. Esse fenômeno, classificado como *Quenching*, pode comprometer a interpretação da análise e a confiabilidade dos resultados.

Dessa forma, a reação de oxidação da PD pela HRP deve, provavelmente, ter produzido substâncias capazes de atuarem como *quenchers*, e extinguirem a fluorescência emitida pelos fluorocromos usados, o PI e a anexina V-FITC. Contudo, investigações posteriores são necessárias a fim de confirmar esse fenômeno assim como determinar a provável substância responsável por esse efeito e o mecanismo através do qual ela atua.

Assim, as metodologias usadas nesse trabalho permitiram evidenciar que a oxidação da PD pela HRP leva à formação de ERO e a indução de citotoxicidade frente a diferentes linhagens celulares. Apesar de a sua ação tóxica ser menos expressiva quando comparado ao sistema IAA/HRP/O₂, a menor toxicidade apresentada pelo substrato PD, quando testado na ausência da enzima, torna o sistema PD/HRP/O₂ uma alternativa interessante para o emprego em terapias que envolvem a ativação enzimática de pró-fármacos.

7 CONCLUSÃO

Através dos estudos realizados nesse trabalho conclui-se que:

- A oxidação da PD pela HRP na ausência de peróxido de hidrogênio leva a produção de ERO que foram devidamente detectadas pelo uso da DCFH-DA, sendo o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio as ERO mais expressivamente formadas durante essa reação.
- A formação de ERO durante a oxidação do IAA pela HRP também foi evidenciada e mais significativa do que a mediada pelo sistema PD/HRP/O₂. O uso de substâncias captadoras de ERO permitiu detectar a formação de H₂O₂ como principal ERO formada durante essa reação.
- O sistema PD/HRP/O₂ assim como o IAA/HRP/O₂ apresenta atividade citotóxica sobre as células de tumor de mama MDA-MB-231, células L929 e leucócitos humanos.
- O sistema IAA/HRP/O₂ desencadeou morte celular via apoptose, o que confirmou as informações presentes na literatura. No entanto, não foi possível determinar com clareza o tipo de morte celular induzida pelo sistema PD/HRP/O₂.
- A oxidação da PD pela HRP induziu uma morte celular menos expressiva quando comparado a catalise do IAA por essa mesma enzima. Contudo, a PD apresentou menor toxicidade, quando administrada de forma isolada, o que torna o sistema PD/HRP/O₂ uma alternativa interessante para o emprego em terapias que envolvem a ativação enzimática de pró-fármacos.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados observados em estudos *in vitro* podem não corresponder aos obtidos *in vivo*, uma vez que as células quando cultivadas adquirem anormalidades adicionais, o que associado ao fato de estarem fora do microambiente tumoral pode torná-las mais sensíveis as intervenções terapêuticas que podem não ser ativas sobre os tumores originais (CHAVEZ; GARIMELLA; LIPKOWITZ, 2010). Tupper et al. (2010) em um estudo para avaliação *in vivo* da ação antitumoral da terapia GDEPT empregando o sistema IAA/HRP obteve uma modesta redução do crescimento tumoral, apesar dos excelentes e animadores resultados *in vitro*. Observou-se também nesse estudo, o aparecimento de efeitos adversos graves após a administração de doses múltiplas do IAA na concentração de 300 mg/Kg, toxicidade essa que nunca havia sido evidenciada nos ensaios *in vitro*.

Por essa razão, ensaios posteriores são necessários, não só a fim de elucidar com clareza as espécies formadas pela reação de oxidação da PD pela HRP e o mecanismo de morte celular mediado pelo sistema PD/HRP/O₂, assim como para avaliar a catálise desse substrato, quando a enzima HRP encontra-se conjugada ao anticorpo monoclonal, e dessa forma, o comportamento citotóxico *in vitro* e *in vivo* desse sistema, a fim de comprovar a especificidade do mesmo e a baixa toxicidade do substrato, o que é primordial para o emprego desse sistema na terapia ADEPT.

De qualquer forma, os resultados até então obtidos representam um estímulo para a realização de novos estudos envolvendo o emprego da PD, assim como de novos pró-fármacos estruturalmente semelhantes a ela, que possam ser empregados na terapia ADEPT como substratos da HRP.

REFERÊNCIAS

ALTMAN, S. A.; RANDERS, L.; RAO, G. Comparison of Trypan blue dye exclusion and fluorometric mammalian cell viability determinations. **Biotechnology Progress**, v. 9, p. 671-674, 1993.

Animal cell culture guide: tips and techniques for continuous cell lines. American Type Culture Collection (ATCC) (2014). Disponível em: <
https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture_Guide.pdf>. Acesso em: 02 de janeiro de 2014.

ANDRADE, M.; SILVA, S. R. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 60, p. 331-335, 2007.

ANDRADE JÚNIOR, D. R. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 3, p. 60-68, 2005.

ANTOGNELLI, C. et al. A novel mechanism of methylglyoxal cytotoxicity in prostate cancer cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, p. 836-844, 2013.

AUGUSTO, O.; BECHARA, E.J.H. Hemin-catalyzed generation of triplet acetone. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 631, p. 203-209; 1980.

AVELAR-FREITAS, B. A. et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 18, p. 1-9, 2014.

BABICH, H.; BOREFREUND, E. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2101-2103, 1991.

BAGSHAW, K. D. Antibody-directed enzyme prodrug therapy for cancer: its theoretical basis and application. **Molecular Medicine Today**, v. 1, p. 424-431, 1995.

BAGSHAW, K. D. et al. Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). **Annals of Oncology**, v. 5, p. 879-891, 1994.

BAGSHAW, K. D. et al. Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a pilot scale clinical trial. **Tumor Target.**, v. 1, p. 17- 29, 1995.

BAGSHAW, K. D. et al. A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites. **British Journal of Cancer**, v. 58, P. 700-703, 1988.

BARRERA, G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. **International Scholarly Research Network**, v. 2012, p. 1-21, 2012.

BAXTER, L. C. et al. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. **European Cells and Materials**, v. 4, p. 1-17, 2002.

BERGLUND, G.I.; CARLSSON, G. H.; SMITH, A. T.; SZÖKE, H.; HENRIKSEN, A.; HAJDU, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. **Nature Publishing Group**. v. 417, p. 463-468, 2002.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 127-152, 2005.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v. 48, p. 3-8, 2000.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIDWELL, D. E. et al. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bulletin of the World Health Organization, v. 54, p. 129-139, 1976.

BLAKEY, D.C. et al. Anti-tumor effects of na antibody-carboxypeptidase G2 conjugate in combination with phenol mustard prodrugs. **British Journal of Cancer**, v. 72, p. 1083-1088, 1995.

BLAU, L.; MENEGON, R. F.; CHUNG, M. C. Pró-fármaco ativado por enzima, uma estratégia promissora na quimioterapia. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1307-1317, 2006.

BORENFREUND, E.; BABICH, H. *In vitro* cytotoxicity of heavy metals, acrylamide, and organotin salts to neural cells and fibroblasts. **Cell Biology and Toxicology**, v. 3, p. 63-73, 1987.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays- The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicology in Vitro**, v. 2, p. 1-6, 1988.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, p. 7-9, 1984.

BRINKLEY, B. R. et al. Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro. **Cancer Research**, v. 40, p. 3118-2129, 1980.

BURDALL, S. E.; HANBY, A. M.; LANSDOWN, M. R.; SPEIRS, V. Breast cancer cell lines: friend or foe? **Breast Cancer Research**, v. 5, n. 2, p. 89-95. 2003.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz: Fundamentos de Química Clínica**. São Paulo: Elsevier, 2008. 984 p.

CAILLEAU, R. et al. Breast tumor cell lines from pleural effusions. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, p. 661-674, 1974.

CAILLEAU, R.; OLIVÉ, M.; CRUCIGER, Q. V. J. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. **In Vitro**, v. 14, p. 911-915, 1978.

CAO, Y. et al. Cancer research: past, present and future. **Nature Cancer Reviews**, v. 11, p. 749-754, 2011.

CAPUCHA, V. et al. Development of triazene prodrugs for ADEPT strategy: new insights into drug delivery system based on carboxypeptidase G2 activation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 6903-6908, 2012.

CHAIRAM, S.; BUDDHALEE, P.; AMATATONGCHAI, M. A novel hydrogen peroxide biosensor based on Horseradish peroxidase immobilized on poly(aniline-co-o-aminobenzoic acid) modified glassy carbon electrode coated with chitosan film. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, p. 10250-10264, 2013.

CHAPPLE, M. R.; JONHSON, G. D.; DAVIDSON, R. S. Fluorescence quenching a practical problem in flow cytometry. **Journal of Microscopy**, v. 159, p. 245-254, 1990.

CHAVEZ, K.; GARIMELLA, S. V.; LIPKOWITZ, S. Triple negative breast câncer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. **Breast Disease**, v. 32, p. 35-48, 2010.

CHUNG, M. C et al. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 155-179, 2005.

CORRIE, P. G. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*, v. 36, p. 24-28, 2007.

CUNHA, L. T. et al. Microbicidal action of indole-3-acetic acid combined with horseradish peroxidase on *Prototheca zopfii*. **Mycophatologia**, v. 169, p. 99-105, 2010.

CUNHA, S. S. et al. Efeitos da radioterapia no tecido ósseo. **Radiologia Brasileira**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 189-192, 2007.

CZARNETZKI, A. Pathological changes in the morphology of the young paleolithic skeletal remains from Stetten (south-west Germany). **Journal of Human Evolution**, v. 9, p. 15-17, 1980.

CZECH, A.; WOJCJECHOICZ, M. The crosslinking reaction of acrylic PSA using chelate metal acetylacetonates. **European Polymer Journal**, v. 42, 2153-2160, 2006.

DAI, M. et al. Tumor-targeted gene therapy using Adv-AFP-HRPC/IAA prodrug system suppresses growth of hepatoma xenografted in mice. **Cancer Gene Therapy**, v. 19, p. 77-83, 2012.

DALMAZZO, L. F. F. et al. Antibody-targeted horseradish peroxidase associated with indole-3-acetic acid induces apoptosis in vitro in hematological malignancies. **Leukemia Research**, v. 35, p. 657-662, 2011.

DAVID, A. R.; ZIMMERMAN, M. R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 728-733, 2010.

DE MELO, M. P. et al. The mechanism of indole acetic acid cytotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 148, p. 103-111, 2004.

DE MELO, M. P. et al. Effect of Indole Acetic Acid on Oxygen Metabolism in Cultured Rat Neutrophil. **General Pharmacology**, v. 31, p. 573-578, 1998.

DENNY, W. A. Prodrug strategies in cancer therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 577-595, 2001.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A history of câncer chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, p. 8643-8653, 2008.

DOBSON, J. John Hunter's views on câncer. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v. 25, p. 176-181, 1959.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 66, p. 1191-308, 1981.

DUARTE, R. A. **Sinalização celular para apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo de mama (ZR 7531) tratadas com alcalóides isolados de *Pterogyne nitens***. Araraquara, SP: USP, 2010. 153 p. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Araraquara, 2010.

DUNFORD, H.B. **Heme peroxidases**. New York: Wiley-VCH, 1999.

EFTINK, M. R.; GHIRON, C. A. Fluorescence quenching studies with proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 114, p. 199-227, 1981.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicology Pathology**, v. 35, p. 495-516, 2007.

ENGLISH, D.; ANDERSEN, B.R. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leucocytes on discontinuous density gradient of Ficoll-Hypaque. **Journal Immunology Methods**, v. 5, p. 294, 1974.

FADOK, V. A. et al. Loss of Phospholipid Asymmetry and Surface Exposure of Phosphatidylserine Is Required for Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages and Fibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 2, p. 1071–1077, 2001

FALK, S. Principles of cancer treatment by radiotherapy. **Surgery**, v. 21, p. 269-272, 2003.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, p. 455-464, 2002.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, p. 61- 68, 1997.

FOLKES, L. K. et al. 5-fluorindole-3-acetic acid: a prodrug activated by a peroxidase with potencial for use in target cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 265-272, 2002.

FOLKES, L. K.; ROSSITER, S.; WARDMAN, P. Reactivity toward thiols and cytotoxicity of 3-methylene-2-oxindoles, cytotoxins from indole-3-acetic acids, on activation by peroxidases. **Chemical Research in Toxicology**, vol.15, p.877-882, 2002.

FOLKES, L. K.; WARDMAN, P. Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species- a potencial new role for plant auxins in cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, p. 129-136, 2001.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171-177, 2006.

GIOCONDO, M. P. **Avaliação da atividade apoptótica de sustância pura isolada de *Cryptocarya mandioccana* em células de carcinoma cervical imortalizadas pelo Papiloma vírus humano (HPV)**. Araraquara, SP: USP, 2007, 70 p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Araraquara, 2007.

GORDON, G. F.; BARR, S. FRAY, R. J. Origin of urinary auxin in germfree and conventional mouse. **American Journal of Physiology**, v. 222, p. 399-403, 1972.

GOTTESMAN, M. N. Mechanisms of câncer drug resistance. **Annual Review of Medicine**, v.53, p. 615-627, 2002.

GRECO, O.; DACHS, G. U. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future prospectives. **Journal of cellular physiology**, v. 187, p. 22-36, 2001.

GRECO, O. et al. Development of a novel enzyme/prodrug combination for gene therapy of cancer: horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid. **Cancer Gene Therapy**, v. 7, p. 1414-1420, 2000.

GRECO, O. et al. Horseradish peroxidase-mediated gene therapy: choice of prodrugs in oxic and anoxic tumor conditions. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 151-160, 2001.

GROGAN, G. Emergent mechanistic diversity of enzyme-catalysed β -diketone cleavage. **Biochemical Journal**, v. 388, p. 721-730, 2005.

Guide to subculturing cell line monolayers. Technical bulletin nº4. American Type Culture Collection (ATCC) (2010). Disponível em :<
<http://www.atcc.org/~media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb04.ashx>>. Acesso em: 18 de novembro de 2012.

GWYNNE, S.; STAFFURTH, J. Principles of cancer treatment by radiotherapy. **Surgery**, v. 30, p. 191-193, 2012.

HAN, S. I.; KIM, Y. S.; KIM, T. H. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. **BMP reports**, v. 41, p. 1-10, 2008.

HATOK, J. et al. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 9, p. 1-7, 2009.

HINGORANI, R. et al. Detection of apoptosis using the BD annexin V FITC assay on the BD FACSVerse™ System. **BD Biosciences**, 2011.

HO, A. N.; PATONAY, G.; WARNER, I. M. Bioanalytical applications of fluorescence quenching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 5, p. 37-43, 1986.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H.; PETTIT, J. E. **Fundamentos em hematologia**. Porto Alegre: Artmed. 2008.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, p.714-726, 2013.

HOWES, B. D. et al. Spectroscopic and kinetic properties of the horseradish peroxidase mutant T171S. **FEBS Journal**, v. 272, p. 5514-5521, 2005.

HUANG, C. et al. Apoptosis of pancreatic cancer BXPC-3 cells induced by indole-3-acetic acid in combination with horseradish peroxidase. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 29, p. 4519-4523, 2005.

HUSSAIN, R. F.; NOURI, A. M. E.; OLIVER, R. T. D. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 160, p. 89-96, 1993.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014>. Acesso em: 28 de dezembro de 2013.

JONES, L.H.; WENTWORTH JÚNIOR, P. The therapeutic potential for catalytic antibodies: from a concept to a promise. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.1, p. 125-132, 2001.

KAISER, P. M. Substrate inhibition as a problem of non-linear steady state kinetics with monomeric enzymes. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 8, p. 431-442, 1980.

KALAPOUS, M. P. Methylglyoxal toxicity in mammals. **Toxicology Letters**, v.73, p. 3-24, 1994.

KEIZER, H. G. et al. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. **Pharmacology e Therapeutics**, v. 47, p. 219-231, 1990.

KIM, D. S. et al. Hydrogen peroxide is a mediator of Indole-3-acetic acid/ *Horseradish peroxidase*- induced apoptosis. **FEBS Letters**, v. 580, p. 11439-1446, 2006.

KIM, D. S.; JEON, S. E.; PARK, K. C. Oxidation of indole-3-acetic acid by horseradish peroxidase induces apoptosis in G361 human melanoma cells. **Cellular Signaling**, v. 16, p. 81-88, 2004.

KIM, J. S. Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 25, p. 90-94, 2011.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, v. 38, p. 96-109, 2010.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems:oxidative stress phenomena antioxidants redox reactions and methods for their quantification. **Toxicology Pathology**, v. 30, p. 620-650, 2002.

KÜHL, P. W. Excess-substrate inhibition in enzymology and high-dose inhibition in pharmacology: a re-interpretation. **Biochemical Journal**, v. 298, p. 171-180, 1994.

Latest world cancer statistics global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed. Disponível em: <http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf>. Acesso em: 27 de dezembro de 2013.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Nova York: Springer, 3ª edição, 2009.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIND, M. J. Principles of cytotoxic chemotherapy. **Medicine**, v. 39, p. 711-716, 2011.

LIU, T. et al. Combinatorial effects of Lapatinib and Rapamycin in triplo-negative breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, p. 1460-1469, 2011.

LOWN, J. W.; CHEN, H. Evidence for the generation of free hydroxyl radicals from certain quinone antitumor antibiotics upon reductive activation in solution. **National Research Council of Canada**, v. 59, p. 390-395, 1981.

MAEDA, Y.; FUJIHARA, M.; IKEDA, I. Spectroscopy study on structure of *Horseradish peroxidase* in water and dimethyl sulfoxide mixture. **Biopolymers**, v. 67, n. 2, p. 107-112, 2002.

MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, p. 205-212, 1999.

MAHATO, R.; TAI, W.; CHENG, K. Prodrugs for improving tumor targetability and efficiency. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 659-670, 2011.

MALEK, S. N. A. et al. Phytochemical and Cytotoxic Investigations of *Curcuma mangga* Rhizomes. **Molecules**, v. 16, p. 4539-4548, 2011.

MALEK, S. N. A. et al. Cytotoxic Components of *Pereskia* (Kunth) DC. (Cactaceae) Leaves. **Molecules**, v. 14, p. 1713-1724, 2009.

MARTIN, J. et al. Antibody-directed enzyme prodrug therapy: pharmacokinetics and plasma levels of prodrug and drug in a phase I clinical trial. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 40, p. 189- 201, 1997.

MÁTYUS, L.; SZÖLLÖSI, J.; JENEI, A. Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 83, p. 223-236, 2006.

MELTON, R. G.; SHERWOOD, R. F. Antibody-enzyme conjugates for cancer therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, p. 153-165, 1996.

METODIEWA, D.; DUNFORD, H. B. The reactions of horseradish peroxidase, lactoperoxidase and myeloperoxidase with enzymatically generated superoxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 272-253, 1989.

MILLS, M. H.; FINLAY, D. C.; HADDAD, P. R. Determination of melatonin and monoamines in rat pineal using reversed-phase ion-interaction chromatography with

fluorescence detection. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v. 564, p. 93-102, 1991

MIRANDA, R. B. **Citotoxicidade de alguns cimentos reparadores de perfuração radicular sobre células L929**. Duque de Caxias, RJ: UNIRIO, 2007, 107 p. Dissertação (Mestrado)- Programa de pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Duque de Caxias, 2007.

MOHAMED, S. A. et al. Horseradish peroxidase and chitosan: Activation, immobilization and comparative results. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 295-300, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, v. 65 (1-2), p. 55-63, 1983.

MYHRE, O. et al. Evaluation of the probes 2,7-dichlorofluorescein diacetate, luminol and licigenin as indicators of reactive species formation. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 1575-1582, 2003.

NAVES, A. F. **Estudo da adsorção de Horseradish peroxidase (HRP) sobre superfícies planas e de sua atividade catalítica**. São Paulo, SP: USP, 2008, 131 p. Tese (Doutorado)- Programa de pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

NICULESCU-DUVAZ, I.; SPRINGER, C. J. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 26, p. 151–172, 1997.

OHLSSON, P.J.; PAUL, K.G. Molar absorvity of horseradish-peroxidase. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 30, p. 373-375, 1976.

OSIPOVITCH, D. et al. Design and analysis of immune-evading enzymes for ADEPT therapy. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 25, p. 613-623, 2012.

OZDEMIR; K. G.; YILMAZ, H.; YILMAZ, S. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of soft lining material on L929 cells by MTT assay. **Cytokine**, v. 5, p. 463-470, 2008.

PACKER, L. Oxidation, antioxidants, nutrients and the athlete. **Journal of Sports Sciences**, v. 15, p. 353-363, 1997.

PERCARIO, S.; FREUZ, A. C.; Avaliação Laboratorial dos radicais livres. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Biomolecular e Radicais Livres**, São Paulo, v. 5, p. 5-11, 1995.

PEREIRA, D. H. et al. The triad indole-3-acetic acid ethyl ester/esterase/horseradish peroxidase as a new cytotoxic prodrug/enzyme combination. **Applied Cancer Research**, v. 30, p. 204-209, 2010.

PETIT, J. M; DENIS-GAY, M.; RATINAUD, M. H. Assessment of fluorochromes for cellular structure and function studies by flow cytometry, v. **Biology of the Cell**, v. 78, p. 1-13, 1993.

POLJAKOVÁ, J. et al. Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases. **Biomedical Papers is an official journal of the Palacký University**, v. 149, p. 449-453, 2005.

PUGINE, S. M. P. **Efeito do sistema ácido indol-3-acético/peroxidase de raiz forte sobre a viabilidade de *Staphylococcus aureus***. Pirassununga, SP: USP, 2008, 97 p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Química de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, 2008.

PUGINE, S. et al. Toxicity of indole-3-acetic acid combined with horseradish peroxidase on *Staphylococcus aureus*. **WebmedCentral Microbiology** v. 665, p. 1-9, 2010.

RAZOLA, S. S. et al. Hydrogen peroxide sensitive amperometric biosensor based on *Horseradish peroxidase* entrapped in a polypyrrole electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v.17, p. 921-928, 2002.

REEDY, J. Galen on Cancer and Related Diseases. **Clio Medica**, v. 10, p. 227-238, 1975.

REED, M. C.; LIEB, A.; NIJHOUT, H. F. The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions. **Bioessays**, v. 3, p. 422-429, 2010.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Publishing Group**, v. 3, p. 1125-1131, 2008.

REPETTO, M.; SEMPRINE, J.; BOVERIS, A. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/lipid-peroxidation-chemical-mechanism-biological-implications-and-analytical-determination>>. Acesso em: 17 de dezembro de 2013.

RIBATTI, D.; MANGIALARDI, G.; VACCA, A. Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 6, p. 145-149, 2006.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, p. 133-149, 2005.

RIEGER, A. M. et al. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. **Journal of Visualized Experiments**, v. 50, p. 1-4, 2011.

RODRIGUES, A.P. **Oxidação de compostos β -dicarbonílicos por peroxidases**. Araraquara, SP: UNESP, 2007. 143 p. Tese (Doutorado)- Programa de pós-graduação em análises clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Araraquara, 2007.

RODRIGUES, A. P. et al. Oxidation of acetylacetone catalysed by horseradish peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 1755-1761, 2006.

ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v. 3, p. 317-320, 2003.

ROMERO, D. et al. Morphological characterisation of BGM (*Buffalo Green Monkey*) cell line exposed to low doses of cadmium chloride. **Toxicology in vitro**, v. 17, p. 293-299, 2003.

ROOSEBOOM, M.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, P. E. Enzyme-Catalyzed Activation of Anticancer Prodrugs. **Pharmacological Reviews**, v. 56, p. 53-102, 2004.

ROSSITER, S.; FOLKES, L. K.; WARDMAN, P. Halogenated indole-3-acetic acids as oxidatively activated prodrugs with potential for targeted cancer therapy, v. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 2523-2526, 2002.

ROTA, C.; CHIGNELL, C. F.; MASON, R. P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2,7-dichlorofluorescein by *Horseradish peroxidase*: possible implications for oxidative stress measurements. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 27, p. 873-881, 1999.

SAEED, S. A. et al. Antioxidants: Their role in health and disease. **International Journal of Pharmacology**, v. 1, p. 226-233, 2005.

SAVITSKY, P. A. et al. Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. **The Biochemical Journal**, v. 340, p. 579-583, 1999.

SCHELLMANN, N. et al. Targeted Enzyme Prodrug Therapies. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 887-904, 2010.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, p. 308-313, 2004.

SERRANO, M. C. et al. In vitro biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials**, v. 25, p. 5603-5611, 2004.

SHARMA, S. K. Immune response in ADEPT. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 22, p. 369-376, 1996.

SHEIN, C. F. et al. Efeitos colaterais da quimioterapia em pacientes hospitalizados. **Disc. Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas**, Santa Maria, v. 7, n. 1, p. 101-107, 2006.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 81, p. 291-295, 1997.

SIEUWERTS, A. M. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC₅₀-Values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 813-823, 1995.

SILVA, J. S. **Biossensor amperométrico à base de peroxidase em matriz de bastão de grafite comercial: estudos preliminares**. Rio de Janeiro, RJ: UFRJ, 2010. 81 p. Dissertação (Mestrado)- Programa de pós-graduação em Tecnologia em processos químicos e bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SOARES, C.H.L.; BECHARA, E.J.H. Enzymatic generation of triplet biacetyl. **Photochemistry Photobiology**. v. 36, p. 117 – 119, 1982.

SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE, C. B., Química Orgânica. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 2002.

SONI, L. K. Classical QSAR modelling of indole-3-acetic acids for cancer therapy. **International Journal of ChemTech Research**, v. 4, p. 92-98, 2012.

SRIDHAR, T.; SYMONDS, R. P. Principles of chemotherapy and radiotherapy. **Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine**, v. 19, p. 61-67, 2008.

STARE, S. M.; JAZEFOWICZ, J. J. The Effects of environmental factors on cancer prevalence rates and specific cancer mortality rates in a sample of OECD developed countries. **International Journal of Applied Economics**, v. 5, p. 92-115, 2008.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 3, p. 1-2, 2001.

SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **Journal of Cancer Science e Therapy**, v. 1, p. 1-4, 2009.

SYLVESTER, P. W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. **Methods in Molecular Biology**, v. 716, p. 157-168, 2011.

TEIXEIRA, D. et al. β -Diketones as key compounds in free-radical polymerization by enzyme-mediated initiation. **Macromolecules**, v. 32, p. 70-72, 1999.

Thawing, Propagation and Cryopreservation of NCI-PBCF-HTB26 (MDA-MB-231). American Type Culture Collection (ATCC) (2012). Disponível em: <http://physics.cancer.gov/docs/bioresource/breast/NCI-PBCF-HTB26_MDA-MB-231_SOP-508.pdf>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2012.

The History of Cancer. American Cancer Society. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf.pdf>>. Acesso em: 13 de novembro de 2013.

THORNALLEY, P. J. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification- A role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. **General Pharmacology: The Vascular System**, v.27, p. 565-573, 1996.

TIETZE, L. F; SCHMUCK, K. Prodrugs for targeted tumor therapies: recent developments in ADEPT, GDEPT and PMT. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 3527-3547, 2011.

TRÉDAN, O. et al. Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. **Journal of the National Cancer Institute**, v.99, p. 1441-1454, 2007.

TUPPER, J. et al. In vivo characterization of horseradish peroxidase with indole-3-acetic acid and 5-bromoindole-3-acetic acid for gene therapy of cancer. **Cancer Gene Therapy**, v. 17, p. 420-428, 2010.

TUPPER, J. et al. Analysis of the horseradish peroxidase/ indole-3-acetic acid combination in a three-dimensional tumor model. **Cancer Gene Therapy**, vol.11, p.508-513, 2004.

VAN AMERSFOORT, E. S.; VAN STRIJP, J. A. Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes. **Cytometry**, v. 17, p. 294-301, 1994.

VAZ, A. C. N. **Ação do ácido indol-3-acético sobre *Staphylococcus aureus***. Pirassununga, SP: USP, 139 p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

VEITCH, N. C. *Horseradish peroxidase*: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, p. 29-259, 2004.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 167-190, 2000.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labeled expression on Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, p. 39-51, 1995.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 27, p. 612-616, 1999.

WARD, P. Radiotherapy: practical applications and clinical aspects. **Medicine**, v. 32, p. 17-20, 2004.

WARDMAN, P. Indole-3-acetic acids and Horseradish peroxidase: a new prodrug/enzyme combination for targeted cancer therapy. **Current Pharmaceutical Desing**, v. 8, p. 1363-1374, 2002.

WEINER, L. M.; SURANA, R.; WANG, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 317-327, 2010.

WELINDER, K. G. Covalent structure of the glycoprotein Horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). **FEBS Letters**, v. 72, p. 19-23, 1976.

WU, Y.; TIBREWAL, N.; BIRGE, R. B. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. **TRENDS in Cell Biology**, v. 16, n. 4, 2006.

World Health Organization. World cancer factsheet. World cancer burden (2008).

Disponível em:

http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/product/CS_FS_WORLD_A4.pdf

. Acesso em 12 de junho de 2013.

XU, K. L. et al. Inhibiting the expression of CD28 costimulatory molecule on human lymphocytes by special RNA. **Chinese Medical Journal**, v. 118, p. 480-486, 2005.

XU, G.; McLEOD, H. L. Strategies for Enzyme/Prodrug Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 3314-3324, 2001.

YANG, Y. et al. Enzyme-mediated hydrolytic activation of prodrugs. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 1; p. 143-159, 2011.

YARNOLD, J. Molecular aspects of cellular responses to radiotherapy. **Radiotherapy Oncology**, v. 44, n. 1, Jul, p. 1-7. 1997.

ZAFIR-LAVIE, I.; MICHAELI, Y.; REITER, Y. Novel antibodies as anticancer agents. **Oncogene**, v. 26, p. 3714–3733, 2007.

ZAWILSKA, J. B.; WOJCIESZAK, J.; OLEJNICZAK, A. B. Prodrugs: A challenge for the drug development. **Pharmacological Reports**, v. 65, p. 1-14, 2013.

APÊNDICE A- Ação dos “scavengers” catalase (CAT), formato de sódio (FS) e superóxido dismutase (SOD) sobre a diclorofluoresceína (DCFH)

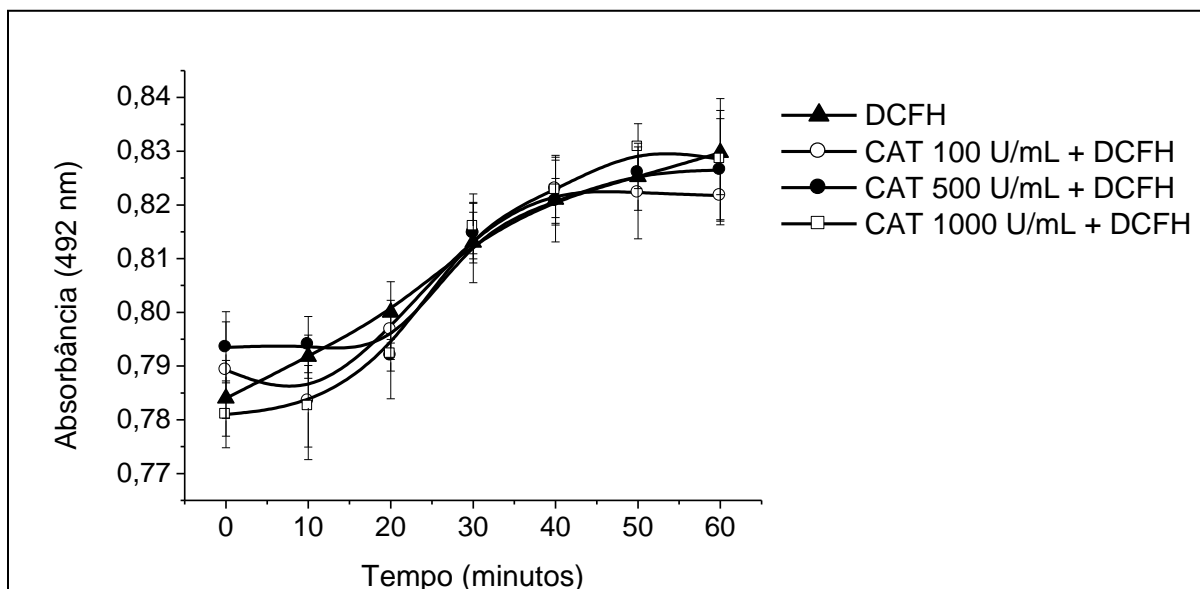


FIGURA A1: Ação da catalase sobre a diclorofluoresceína. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (▲), (○), (●) e (□) não apresentaram diferença estatisticamente significativa em qualquer tempo de reação, $p<0,05$.

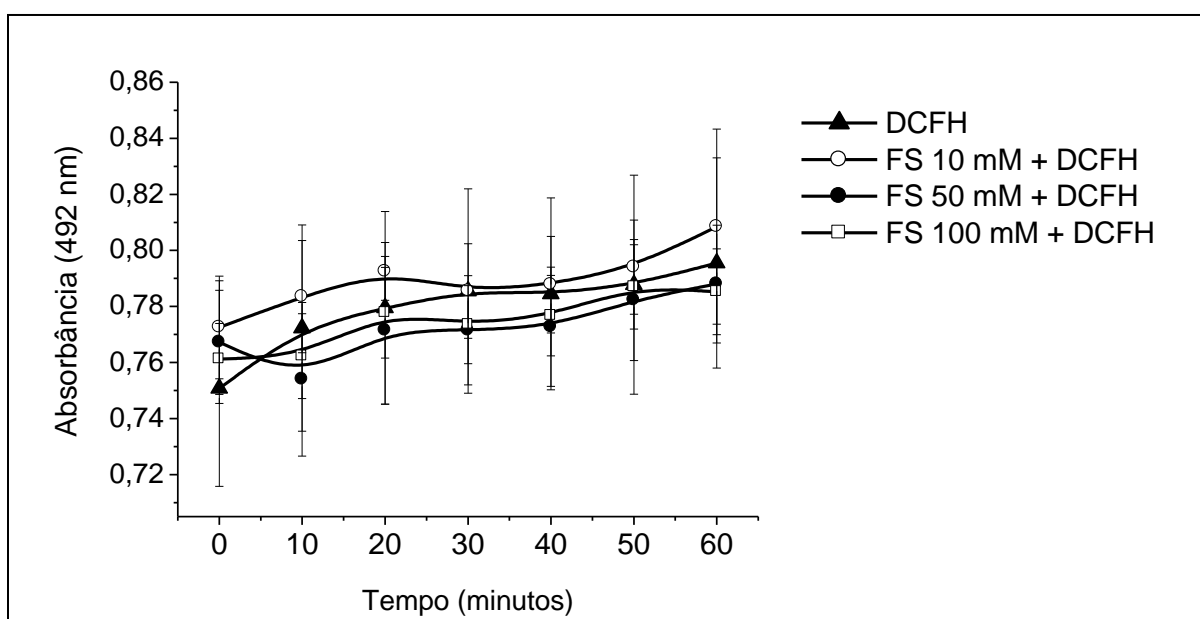


FIGURA A2: Ação do formato de sódio sobre a diclorofluoresceína. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (▲), (○), (●) e (□) não apresentaram diferença estatisticamente significativa em qualquer tempo de reação, $p<0,05$.

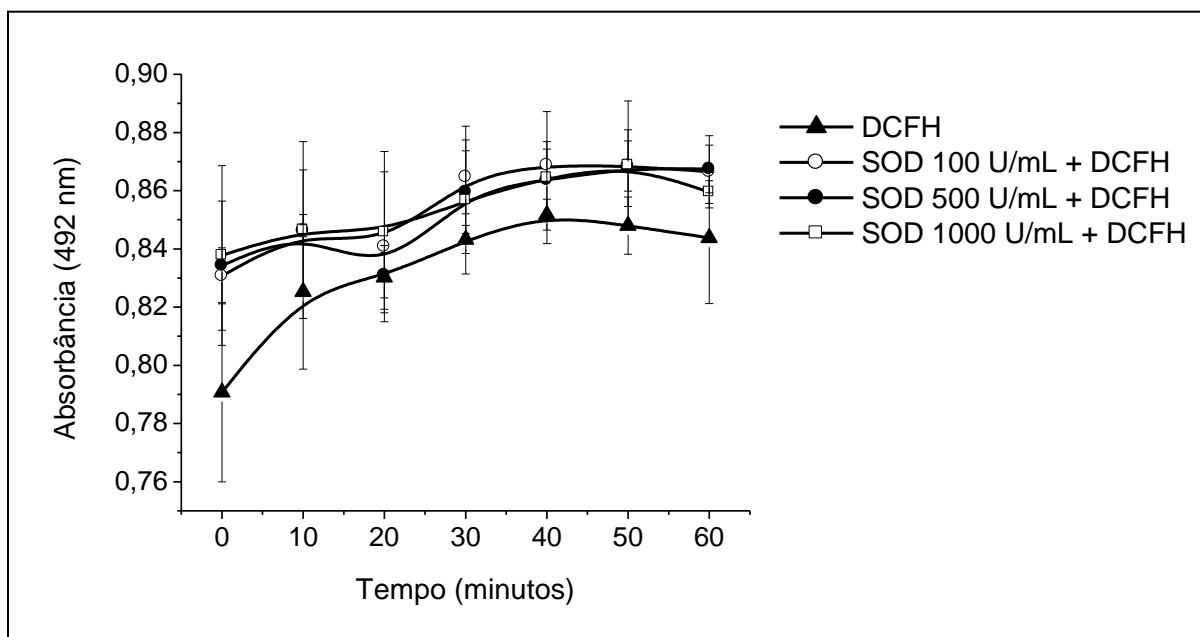


FIGURA A3: Ação da superóxido dismutase sobre a diclorofluoresceína. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n=4$) feitos em triplicata (três réplicas para cada experimento). As curvas (▲), (○), (●) e (□) não apresentaram diferença estatisticamente significativa em qualquer tempo de reação, $p<0,05$.

APÊNDICE B- Avaliação da morte celular da linhagem MDA-MB-231 induzida pelos substratos IAA ou PD e pela enzima HRP

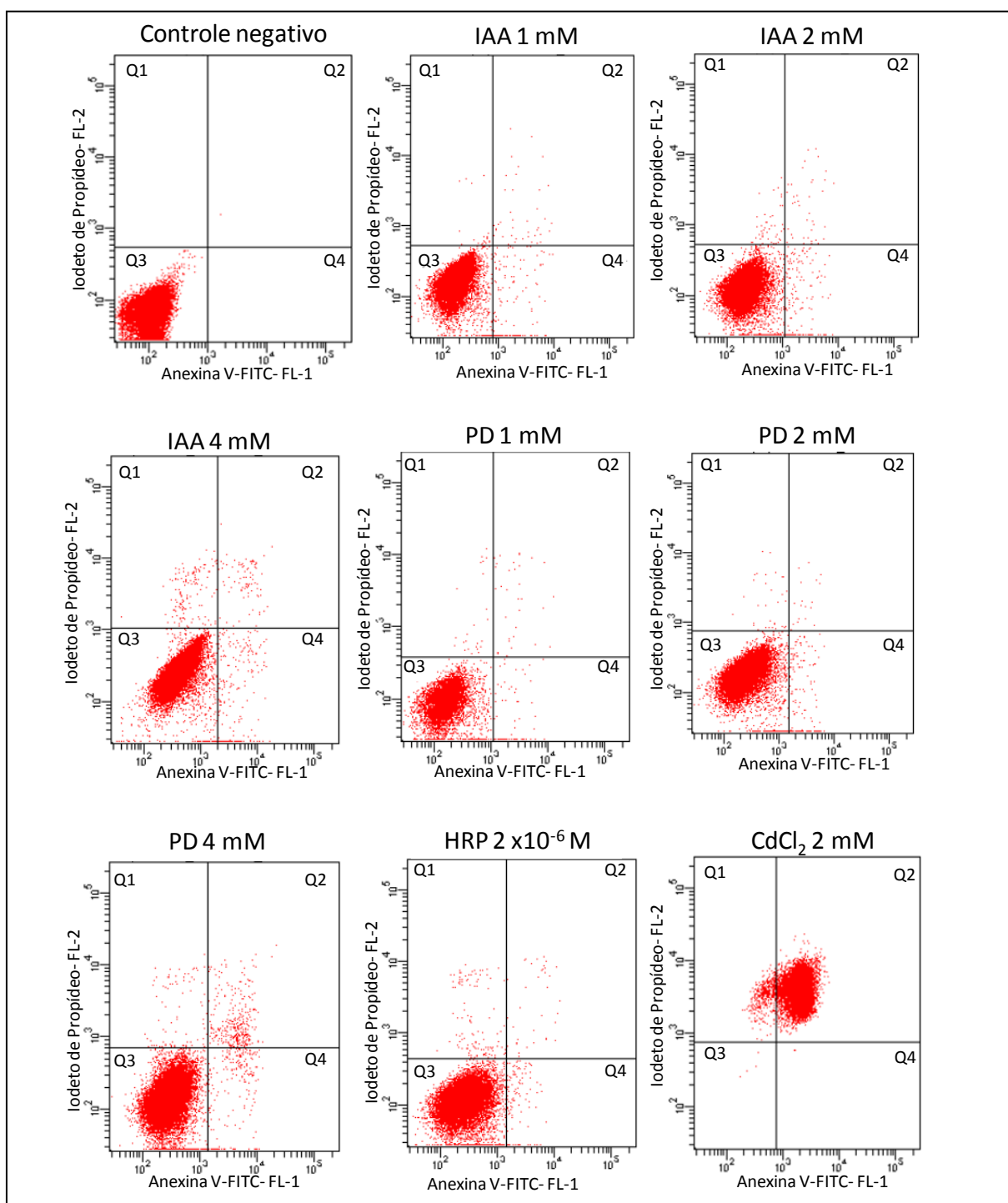


FIGURA B1: Gráfico de distribuição pontual (*dot plot*) representativo de células coradas com anexina V-FITC e PI. Os quadrantes representam: Q1- células mortas por necrose (AV-, IP+); Q2- células em estágio de apoptose tardia (AV+, IP+); Q3- células viáveis (AV-, IP-); Q4- células em estágio inicial de apoptose (AV+, IP-). O controle negativo foi constituído por células não tratadas e como controle positivo foi utilizado o CdCl_2 (2 mM). As células do controle negativo apresentaram-se concentradas no quadrante Q3 ($99,73 \pm 0,46$) assim como as células tratadas com os substratos PD ($Q3_{PD\ 1\ mM} = 98,4 \pm 0,173$; $Q3_{PD\ 2\ mM} = 98,6 \pm 0,56$; $Q3_{PD\ 4\ mM} = 98,37 \pm 1,20$) e IAA ($Q3_{IAA\ 1\ mM} = 98,1 \pm 0,56$; $Q3_{IAA\ 2\ mM} = 98,83 \pm 2,89$; $Q3_{IAA\ 4\ mM} = 92,56 \pm 2,51$), e com a enzima HRP ($Q3_{HRP} = 98,83 \pm 0,40$).